GLEICHZEITIGE BESTIMMUNG VON CORTICOSTERON, ALDOSTERON UND CORTISOL IN KLEINEN PLASMAPROBEN DURCH MECHANISIERTE SEPHADEX LH-20 SÄULENCHROMATOGRAPHIE UND RADIOIMMUNOASSAY

Peter Lehmann

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

AUS DER KINDERKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN IM DR. VON HAUNERSCHEN KINDERSPITAL
Direktor: Professor Dr. K. Betke

Gleichzeitige Bestimmung von Corticosteron, Aldosteron und Cortisol in kleinen Plasmaproben durch mechanisierte Sephadex LH-20 Säulenchromatographie und Radioimmunoassay

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Peter Lehmann

aus

Tutzing

München 1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Privatdozent Dr. W.G. Sippell
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Betke
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	14.05.1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	
1.1.	Entwicklung des Radioimmunoassay und der Chromatographie	1
1.2.	Struktur der Nebennierenrindensteroide	3
1.3.	Biosynthese der Nebennierenrindensteroide	4
1.4.	Aufgabenstellung dieser Arbeit	6
2.	METHODIK	
2.1.	Materialien	8
2.1.1.	Lösungsmittel und Reagenzien	8
2.1.2.	Tritiierte Steroide und deren Reinigung	10
2.1.3.	Geräte	12
2.1.4.	Reinigung der Glasgeräte	13
2.1.5.	Plasmaproben für ACTH- und Dexamethason-Test	14
2.2.	Statistik	15
2.3.	Flüssigkeitsszintillationszählung	17
2.3.1.	Prinzip	17

2.3.2.	Auslöschphänomen (quenching)	18
2.3.3.	Photolumineszenz	18
2.4.	Analysengang	19
2.5.	Extraktion der Steroide aus dem Plasma	20
2.6.	Chromatographie	23
2.6.1.	Sephadex LH-20 und seine Eigenschaften	23
2.6.2.	Trennungsmechanismen von Sephadex LH-20 bei Verwendung eines wenig polaren Laufmittels	25
2.6.3.	Berechnung von Chromatographieparametern	30
2.6.3.1.	Verteilungskoeffizient	30
2.6.3.2.	Quantitative Trennung zweier Substanzen	31
2.6.3.3.	"Theoretische Böden"	32
2.6.4.	Reproduzierbarkeit der Chromatographie	32
2.6.5.	Packen und Aufbewahren der Säulen	33
2.6.6.	Erstellung der Elutionsmuster der 60 cm Sephadex LH-20 Säule mit Hilfe tritiierter Steroide	35
2.6.7.	Berechnung der Wiederfindung	36
2.6.8.	Aufbau der mechanisierten Chromatographieanlage	36

2.6.9.	Technische Besonderheiten bei der mechanisierten Chromatographie	39
2.7.	Radioimmunoassay	
2.7.1.	Das Prinzip des Radioimmunoassay (RIA)	40
2.7.2.	Standardkurven	43
2.7.3.	Charakterisierung der Steroid-Antiseren	45
2.7.3.1.	Steroid-Albumin-Konjugate	45
2.7.3.2.	Titer von Antiseren	47
2.7.3.3.	Affinität eines Antiserums	48
2.7.3.4.	Spezifität und Kreuzreaktionen eines Antiserums	50
2.7.4.	Bestimmung der praktikablen Inkubationszeit des Aldosteron-RIA	50
2.7.5.	Aktivkohle-Dextran-Suspension. Die Trennung von freiem und antikörpergebundenem Steroid	51
2.7.6.	Qualitätsmerkmale des Radioimmunoassay	55
2.7.6.1.	Spezifität des Radioimmunoassay	55
2.7.6.2.	Der Blank oder Probenleerwert des Radioimmunoassay	55
2.7.6.3.	Der Einfluß der Chromatographie auf die Gleichgewichtsreaktionen des RIA	58
2.7.6.4.	Empfindlichkeit (sensitivity)	58

2.8.	Qualitätsmerkmale der Methode	
2.8.1.	Die Richtigkeit der Methode (accuracy)	60
2.8.2.	Die Reproduzierbarkeit der Methode (between assay precision)	61
2.9.	Auswertung der Meßergebnisse	63
2.10.	Arbeitsschema des RIA	65
3.	ERGEBNISSE	
3.1.	Extraktion	67
3.2.	Chromatographie	
3.2.1.	Elutionsmuster der 60 cm Säule	67
3.2.2.	Trennungsmechanismen der Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 und Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v)	69
3.2.3.	Reproduzierbarkeit der Elution	71
3.2.4.	Vergleich der Elutionsmuster von Säule 1 und 6 bei der mechanisierten Chromatographie	72
3.2.5.	Wiederfindung und Peakbreite der tritiierten Steroide bei der Festlegung der Elutionsmuster der 60 cm Sephadex LH-20 Säule mit Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v).	74

3.2.6.	Wiederfindungen, Peakbreiten und Variationskoeffizienten der Wiederfindungen zwischen den Säulen 1 und 6 während mechanisierter Chromatographie	75
3.2.7.	Berechnung von Chromatographieparametern	77
3.3.	Radioimmunoassay	
3.3.1.	Standardkurven	79
3.3.2.	Der Einfluß der Chromatographie auf die Gleichgewichtsreaktionen des RIA	82
3.3.3.	Spezifität der Antiseren	83
3.3.4.	Die Inkubationszeit beim Aldosteron-RIA	85
3.3.5.	Die Empfindlichkeit (sensitivity) und die Blanks der Assays	86
3.4.	Qualitätsmerkmale der Methode	
3.4.1.	Die Richtigkeit der Methode (accuracy)	89
3.4.2.	Die Reproduzierbarkeit der Methode (between assay precision)	92
3.5.	Plasmaspiegel von Corticosteron, Aldosteron und Cortisol nach ACTH- und Dexamethason-Test	94

4.	DISKUSSION	
4.1.	Ansatz und Extraktion	96
4.2.	Chromatographie	98
4.3.	Radioimmunoassay	
4.3.1.	Arbeitsweise	104
4.3.2.	Antiseren	107
4.3.3.	Das Aktivkohle-Trennungsverfahren	108
4.3.4.	Das Blankproblem	110
4.3.5.	Die Spezifität des RIA	112
4.4.	Qualitätsmerkmale der Methode	114
4.4.1.	Die Richtigkeit der Methode (accuracy)	114
4.4.2.	Die Reproduzierbarkeit der Methode (between assay precision)	116
4.5.	Auswertung der Meßergebnisse	118
4.6.	ACTH- und Dexamethason-Test	119
5.	Anwendbarkeit der Methode	120
6.	Zusammenfassung	121

1. EINLEITUNG

1.1. Entwicklung des Radioimmunoassay und der Chromatographie

YALOW und BERSON veröffentlichten 1959 die erste Arbeit über eine radioimmunologische Methode zur Bestimmung von Insulin im Plasma (80). Diese Technik erwies sich bald als eine äußerst empfindliche und spezifische Analysenmethode, die es ermöglicht, Substanzmengen in der Größenordnung von wenigen Picogramm (1pg = 10^{-12}g) quantitativ zu bestimmen. Wichtigste Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit eines spezifischen Antiserums. Anfangs ließen sich nur Antikörper gegen Proteohormone herstellen, da diese Substanzen selbst antigene Eigenschaften besitzen. Als es später möglich wurde, immunologisch indifferente Stoffe, wie z.B. Steroide, an Eiweißmoleküle zu koppeln und ihnen dadurch antigene Eigenschaften zu verleihen, konnte man das Prinzip der radioimmunologischen Analyse auch auf diese Stoffgruppen ausdehnen.

In den letzten 10 Jahren sind radioimmunologische Methoden zu einer zentralen Technik der analytischen Chemie und besonders der Endokrinologie geworden, die heute vielerorts routinemäßig in Diagnostik und Therapieüberwachung eingesetzt werden.

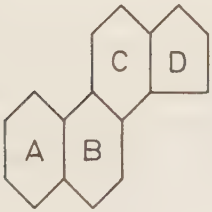
Da sich die Steroidhormone in ihrer chemischen Struktur kaum unterscheiden, zeigen Steroidantiseren häufig Kreuzreaktionen zu einer Vielzahl dieser Verbindungen. Deshalb muß in vielen Fällen vor dem Radioimmunoassay (RIA) eine Trennung dieser Stoffe durchgeführt werden. Die Notwendigkeit der Reinigung wird einerseits durch die Spezifität des Antiserums und andererseits durch die relative Konzentration des zu messenden Steroidhormons (im Vergleich zu den übrigen Steroiden) im betreffenden biologischen Material bestimmt.

Als probates Mittel zur Trennung hat sich die Chromatographie erwiesen. Die Adsorptionschromatographie geht auf TSWETT zurück, der 1910 pflanzliche Pigmente auf einer Säule auftrennte. Er arbeitete mit gefärbten Substanzen und nannte die Methode deshalb Chromatographie (bunt schreiben). MARTIN und SYNGE führten 1941 die Verteilungs- und Papierchromatographie ein. Die Gelfiltration wurde zu einer praktikablen Technik der Steroidanalyse entwickelt, nachdem PORATH und FLODIN über verzweigte Dextrane als Molekülsiebe berichtet hatten (55). SJÖVALL et al. beschrieben als erste die Flüssigkeitschromatographie auf lipophilen Sephadexderivaten (65).

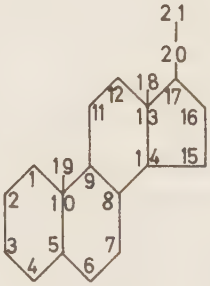
Die heute in der Steroidanalyse gebräuchlichsten Verfahren sind neben der apparativ aufwendigen Gaschromatographie, die Papier- und Dünnschichtchromatographie, sowie die Säulenchromatographie mit Celit und lipophilen Dextranen. Die Anwendbarkeit der zuerst genannten Techniken wird im Vergleich zu den Dextranen beispielsweise durch aus dem Trägermaterial stammende Verunreinigungen eingeschränkt, die sich störend auf die radioimmunologischen Verfahren auswirken.

1.2. Struktur der Nebennierenrindensteroide

Allen Nebennierenrindensteroiden (NNR-Steroide) liegt strukturmäßig das Steran- bzw. Pregnangerüst zugrunde.

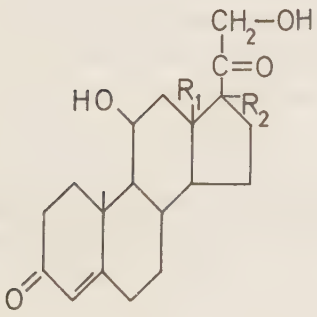


STERAN



PREGNAN

Sowohl C_{19}- wie auch C_{21}-NNR-Steroiden ist eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C_4 und C_5 (Δ_4), die Ketogruppe an C_3, sowie die Methylgruppe an C_{19} gemeinsam. Die in dieser Arbeit gemessenen Hormone tragen darüber hinaus eine Hydroxylgruppe in Stellung 11.



STEROIDE	R_1	R_2
Corticosteron	$-CH_3$	-H
Aldosteron	-CHO	-H
Cortisol	$-CH_3$	-OH

Das Mineralocorticoid Aldosteron unterscheidet sich von den Glucocorticoiden durch die Ketogruppe an C_{18} bzw. die Halbacetalbindung zwischen der Hydroxylgruppe an C_{11} und der Ketogruppe an C_{18}.

1.3. Biosynthese der Nebennierenrindensteroide

Die adulte Nebennierenrinde (NNR) besteht aus drei Schichten. Unter physiologischen Bedingungen werden in der Zona reticularis vorwiegend die Adrogene und Östrogene und in der Zona fasciculata vorwiegend Corticosteron und Cortisol synthetisiert. Die terminale Aldosteronsynthese findet ausschließlich in der äußersten Schicht, der Zona glomerulosa statt (5, 23).

Die Schlüsselsubstanz in der Synthese der NNR-Steroide ist Pregnenolon. Aus Acetat wird intramitochondrial Cholesterin und daraus Pregnenolon gebildet. Durch Wirkung der microsomalen 17-Hydroxylase entsteht 17-Hydroxypregnenolon. Von diesen beiden Substanzen ausgehend verläuft die Synthese parallel bis zu Corticosteron und Cortisol.

So entsteht durch die 3-Dehydrogenase und $\triangle^{5-4}$-Isomerase in zwei Reaktionsschritten Progesteron bzw. 17-Hydroxyprogesteron und daraus 11-Desoxycorticosteron bzw. 11-Desoxycortisol (microsomale 21-Hydroxylase). Corticosteron und Cortisol werden intramitochodrial durch die 11-Hydroxylase gebildet.

Ebenfalls intramitochodrial wird aus Corticosteron 18-Hydroxycorticosteron (18-Hydroxylase) und daraus schließlich Aldosteron (18-Dehydrogenase) synthetisiert (60).

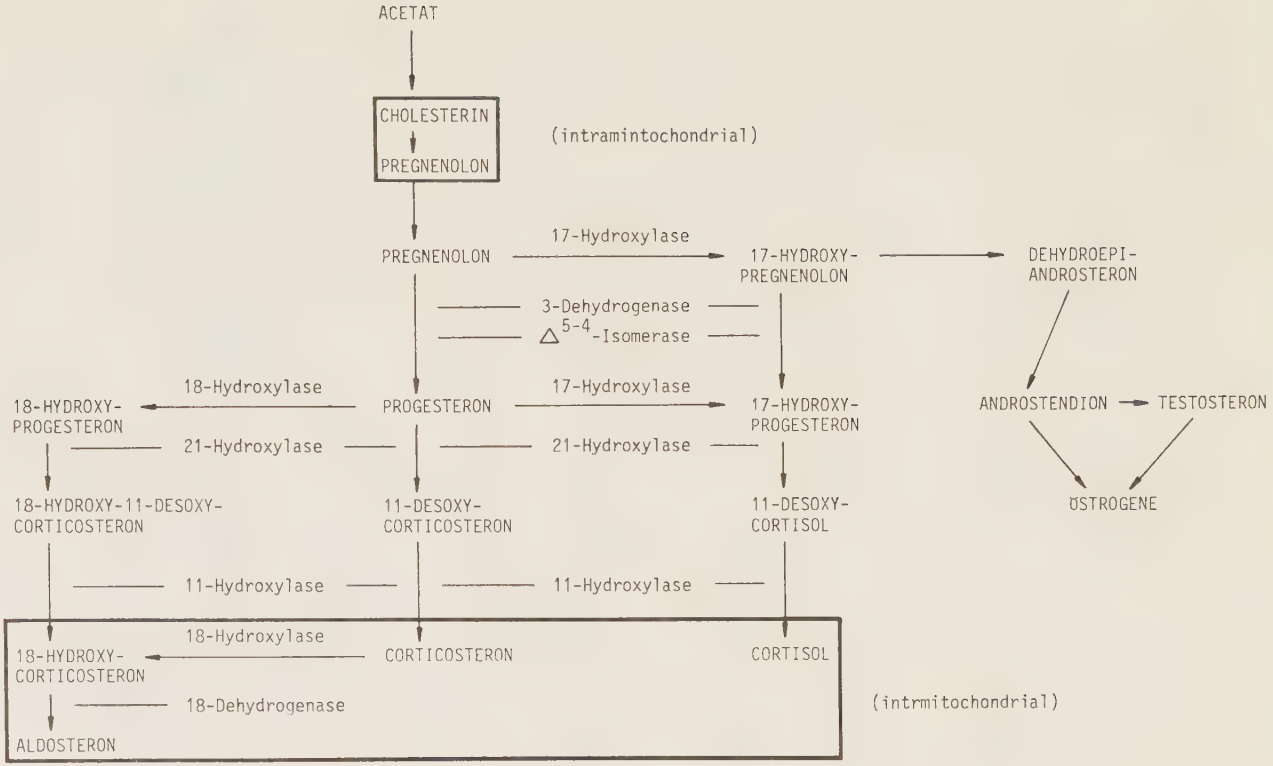


Abb. 1 Biosyntheseweg der Nebennierenrindensteroide.

Ein möglicher Nebenweg der Aldosteronbiosynthese muß erwähnt werden. Die microsomale 18-Hydroxylase führt zur Bildung von 18-Hydroxyprogesteron aus Progesteron.Durch die ebenfalls in den Microsomen lokalisierte 21-Hydroxylase wird daraus 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron gebildet, aus dem schließlich intramitochondrial 18-Hydroxycorticosteron entsteht (11-Hydroxylase). Damit ist die Verbindung zum Hauptweg der Aldosteronbiosynthese hergestellt (60).

Die Biosynthese von Corticosteron und Cortisol wird durch das adrenocorticotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens - ACTH - reguliert, wohingegen die Bildung des Mineralocorticoids Aldosteron von dieser Substanz deutlich weniger abhängig ist. So ist nach Hypophysektomie kein Cortisol mehr im peripheren Plasma nachweisbar, der Aldosteronspiegel aber nur um 1/3 bis 2/3 seiner physiologischen Konzentration erniedrigt. Die Abnahme der Natriumkonzentration sowie eine Volumen-und/oder Druckänderung in den Nierengefäßen führen über den Renin-Angiotensin-Mechanismus zur Steigerung der Aldosteronsekretion. Ferner sind die Kalimkonzentration im arteriellen Blut der NNR und ACTH als direkte Stimuli der Aldosteronbiosynthese nachgewiesen worden, wenn auch ihr Einfluß im Vergleich zum Renin-Angiotensin-System von untergeordneter Bedeutung ist (81).

1.4. Aufgabenstellung dieser Arbeit

Angeregt durch die Versuche von HOLLMANN (31), war es das Ziel dieser Arbeit, eine weitgehend mechanisierte Methode zur Bestimmung von Aldosteron im peripheren Plasma von Hundewelpen zu entwickeln. Wegen des geringen Blutvolumens der 1.000 - 1.500 g schweren Tiere standen nur kleine Plasmaproben zur Verfügung.

VECSEI hatte 1972 ein brauchbares Aldosteron-Antiserum durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen, das er im RIA für freies Aldosteron im Urin benutzte (75). Er stellte uns dieses Antiserum zur Entwicklung einer Bestimmungsmethode für Plasmaaldosteron freundlicherweise zur Verfügung. Das Antiserum zeigt aufgrund der geringen strukturellen Unterschiede der NNR-Steroide unterschiedlich starke Kreuzreaktionen mit einer Vielzahl dieser Steroide. Es war deshalb eine Abtrennung dieser interferierenden Substanzen vor dem Aldosteron-RIA notwendig.

Hierfür bot sich das von MURPHY 1972 beschriebene Chromatographiesystem mit dem lipophilen Sephadex LH-20 als Träger und Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v) als Laufmittel an (47). Die Reproduktion dieser Methode ergab, daß sich mit der von MURPHY angegebenen 40 cm langen Säule für unsere Zwecke keine ausreichende Trennung des Aldosteron besonders von Cortison erzielen ließ. Erst die Verlängerung der Säule auf 60 cm führte zu guten Ergebnissen. Dabei fanden wir für Cortison und Cortisol ebenfalls eine so gute Trennung, daß deren gleichzeitige Isolierung möglich war. Auch die Isolierung von Corticosteron aus dem Plasma von Hundewelpen war mit der 60 cm Säule möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit beschränkte ich mich auf die drei wichtigsten NNR-Steroide bei Hundewelpen - Corticosteron, Aldosteron und Cortisol. Zur radioimmunologischen Bestimmung von Cortisol stand ein in unserem Hause von BIDLINGMAIER hergestelltes Cortisolantiserum zur Verfügung, mit dessen Kreuzreaktion gegen Corticosteron auch dieses Corticosteroid ausreichend genau gemessen werden konnte.

2. METHODIK

2.1. Materialien

2.1.1. Lösungsmittel und Reagenzien

Organische Lösungsmittel wurden in p.a.-Qualität von der Firma MERCK, Darmstadt bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

- Dichlormethan	No.: 6050
- Methanol	No.: 6009
- Dioxan	No.: 3115
- Toluol	No.: 8325
- Äthylenglycol	No.: 9621
- Äthanol	No.: 970

Die Reagenzien stammten mit Ausnahme von Norit A (SERVA) ebenfalls von der Firma MERCK.

- Kaliumchlorid (KCl)	No.: 4936
- Borat (H_3BO_3)	No.: 165
- Kaliumhydroxyd 1N (KOH)	No.: 5033
- Natriumazid (NaN_3)	No.: 6688
- PPO	No.: 2946
- Naphthalin	No.: 6200
- Norit A (Fa. SERVA)	No.: 30890

Sephadex LH-20 und Dextran T 70 wurden von PHARMACIA, Uppsala, Schweden und menschliches Gammaglobulin von der Deutschen KABI GmbH, München bezogen.

- Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v)

- 0,05 M Borat-KCl-Puffer (pH = 8)

6,184 g H_3BO_3 + 7,456 g KCl wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst (Magnetrührer). Das entspricht einem 0,1 molaren Puffer. Diese Lösung wurde quantitativ in einen 2000 ml Meßkolben übergeführt und mit ungefähr 7,8 ml 1N KOH auf pH = 8 eingestellt und anschließend mit Aqua bidest. ad 2000 ml aufgefüllt.

- Gammaglobulin-Borat-Puffer (0,06%)

In einem 5000 ml Meßkolben wurden 300 mg Gammaglobulin + 162,5 mg NaN_3 (zur Vermeidung von Bakterienanwachstum) in ca. 4000 ml Borat-KCl-Puffer gelöst (Magnetrührer). Nach dem vollständigen Lösen der Substanzen wurde mit Borat-KCl-Puffer ad 5000 ml aufgefüllt.

- Aktivkohle-Dextran-Suspension (Dextran/Norit A = 1/10)

In einem 100 ml Meßkolben wurden 250 mg Dextran T 70 (0,25%) + 2,5 g Norit A (2,5%) mit Hilfe eines Magnetrührers in ca. 90 ml Gammaglobulin-Borat-Puffer gelöst. Anschließend wurde mit dem selben Puffer ad 100 ml aufgefüllt.

- Toluol-Szintillator

24 g PPO wurden in 240 ml Methanol und ca. 3000 ml Toluol in einem 5000 ml Meßkolben gelöst (Magnetrührer) und danach mit Toluol ad 5000 ml aufgefüllt.

- Bray-Szintillator

20 g PPO+300 g Naphthalin wurden in einem 5000 ml Meßkolben in 500 ml Methanol + 100 ml Äthylenglycol + ca. 3000 ml Dioxan gelöst (Magnetrührer). Danach wurde mit Dioxan ad 5000 ml aufgefüllt.

- Steroidfreies Plasma

Ein Plasmapool von Mitarbeitern unseres Labors wurde mit Äther im Verhältnis Plasma/Äther = 1/5 (v/v) mindestens 5 mal in einem Scheidetrichter von Hand je 5 Minuten ausgeschüttelt. Danach wurde das Plasma in einem offenen Becherglas etwa 15 Minuten mit einem Magnetrührer gerührt, um alle Ätherrückstände zu entfernen. Der Plasmapool wurde anschließend in 5 ml Portionen eingefroren.

2.1.2. Tritiierte Steroide und deren Reinigung

Die tritiierten Steroide wurden mit einer spezifischen Aktivität von 40 - 60 Ci/mMol von NEW ENGLAND NUCLEAR-CORPORATION, Boston, Mass., USA bezogen und sofort nach Erhalt mit Benzol/Äthanol = 9/1 verdünnt. Dieses Lösungsmittelgemisch ist chemisch neutral, gefriert nicht bei Aufbewahrung im Kühlschrank und kann leicht wieder abgedampft werden. Durch die Verdünnung wurde die Aktivität pro Volumeneinheit geringer und somit die Selbstzerstrahlungsrate erheblich gesenkt. Ein weiterer Faktor der Stabilität tritiierter Verbindungen ist neben dem Lösungsmittelgemisch und der Konzentration die Temperatur. Die Stammlösungen wurden deshalb im Kühlschrank bei 4^{oC} aufbewahrt, da bei dieser Temperatur die Stabilität dieser radioaktiven Verbindungen größer als unterhalb von 0^{oC} ist (8).

Der Bedarf für ca. 3 Monate (2×10^6 cpm etwa 10 ng/ml) wurde vor weiterer Verwendung auf einer 40 cm Sephadex LH-20 Säule und Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v) als Solvens gereinigt. Dabei wurde auf die aus den Vorversuchen bekannten Elutionsmuster dieser Säule zurückgegriffen. Die Reinigung ist notwendig, da durch Selbstzerstrahlung verunreinigte tritiierte Verbindungen zur Abnahme der Wiederfindung bei der Chromatographie führen. Im RIA bewirken sie eine Abnahme des

Anteils des vom Antikörper gebundenen Steroids.

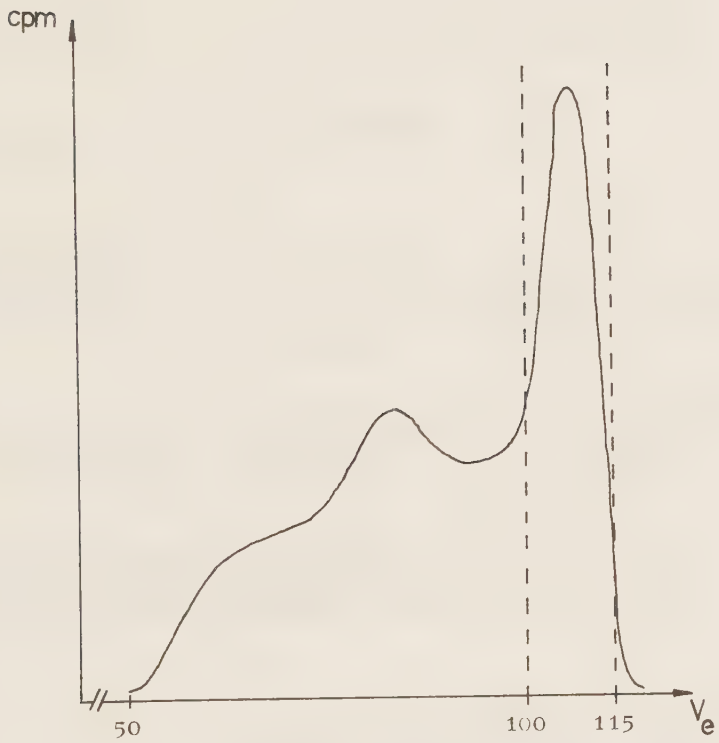


Abb. 2 Reinigung von tritiiertem Cortisol auf einer 40 cm Sephadex LH-20 Säule und Dichlormethan/Methanol (98/2, v/v). Der Bereich zwischen den schraffierten Linien begrenzt die gereinigte Substanz.

Abb. 2 zeigt die Reinigung von tritiiertem Cortisol. Die geringe Steigung des Peaks zwischen den Fraktionen Nr. 50 und 100 stellt wohl den durch Selbstzerstrahlung veränderten Teil des tritiierten Cortisols dar. Der gereinigte Anteil ist in der Abb. durch die beiden gestrichelten Linien begrenzt, die den Fraktionen Nr. 100 und 115 entsprechen.

2.1.3. Geräte

Aufgrund der Aggressivität von Dichlormethan konnten nur folgende Materialien langfristig verwendet werden:
Borsilicatglas, Teflon, Viton und V2A-Stahl.

- Borsilicatglas-Säulen (bürettenartig)
  Innenmaße: 675 x 11 mm, Bepackungsvolumen: 57 cm^3
  475 x 11 mm, " : 38 cm^3
  Fritte: Porenweite 40 - 90 µ, SCHOTT, Mainz
  Feinregulierventile mit nachstellbarem Teflonküken,
  JOBLING Laboratory Division, Stone, Staffs, England, UK.

- Glaskappilardurchflußmesser
  FISCHER & PORTER, Göttingen, Deutschland

Folgende Gräte wurden von der Fa. SERVA-Technik, Heidelberg, Deutschland bezogen:

Elutionspumpe Modell N
Fraktionssammler Linear II
Kontrolleinheit STZ (zur Steuerung über Siphon, Tropfen und Zeit)

6-Kanal-Programmer (lochstreifengesteuert)
Teflonschläuche ID 1,0 mm, OD 2,5 mm
Vitonschläuche ID 1,0 mm, OD 2,5 mm
Multifit-Kupplungen

- Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor, SORVALL RC - 2D

- ISOCAP 300 Flüssigkeitsszintillationsspektrometer,
SEARLE, NUCLEAR CHICAGO Division,

Effektivität für Tritium: ca. 65%
Background: 8,5 cpm (n = 56)
gezählt wurde bis 10 000 cpm, was einem statistischen Zählfehler von 2% entspricht

- Einmalszintillationsgefäße, ZINSSER, Frankfurt a.M., Deutschland
normale Größe 26 x 52 mm
sog. mini-vials 16 x 52 mm

- Einmalpolystyrol-Röhrchen für RIA (10 x 40 mm),
CLINIMED GERÄTE GmbH, Langenfeld, Deutschland

2.1.4. Reinigung der Glasgeräte

Die Glasgeräte, mit Ausnahme der Säulen, wurden nach mehrfachem Spülen mit Detergens und Aqua dest. mit Aluminiumfolie verschlossen und durch Ausglühen über mindestens drei Stunden bei 500^{oC} steroidfrei gemacht (38). Die Aluminiumfolie wurde erst unmittelbar vor Gebrauch wieder entfernt.

2.1.5. Plasmaproben für ACTH- und Dexamethason-Test

Freiwilliger, männlicher Proband, 24 Jahre, gesund

ACTH-Test:

14.25 Uhr Blutentnahme für Basalwerte und anschließend Injektion von 0,25 mg ACTH (Synacthen^{R} CIBA) i.v.

15.25 Uhr Blutentnahme

Dexamethason-Test:

8.45 Uhr Blutentnahme für Basalwerte

22.00 Uhr des gleichen Tages 1,0 mg Dexamethason p.o. (Fortecortin^{R} MERCK)

8.45 Uhr des darauffolgenden Tages Blutentnahme

2.2. Statistik

Folgende statistische Größen wurden berechnet (58):

- arithmetisches Mittel ($\bar{x}$):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + ... + x_n)$$

$$\bar{x} = \frac{S_x}{n - 1}$$

- Standardabweichung (SD):

$$SD = \frac{S(x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

- Variationskoeffizient (CV):

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} - 100\ \% \qquad \text{für } x \neq 0$$

- Korrelationskoeffizient (r):

Der Korrelationskoeffizient (r) beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Wertepaar x und y. Der stärkste Zusammenhang liegt vor, wenn der Wert y eindeutig durch den Wert x bestimmt wird (und umgekehrt). Liegt eine streng lineare Abhängigkeit vor, so nimmt r seinen höchstmöglichen Wert +1 bzw. seinen kleinstmöglichen Wert -1 an. Besteht zwischen den Größen x und y überhaupt kein Zusammenhang, so ist r = 0.

- Regressionskoeffizient ($b_{y/x}$):

Der Regressionskoeffizient ($b_{y/x}$) gibt an, um wieviel der Wert des Merkmales y sich im Durchschnitt ändert, wenn der Wert des Merk-

males x um eine Einheit (Maßeinheit) zunimmt.

$$b_{y/x} = \frac{S(x - \bar{x})\ (y - \bar{y})}{S(x - \bar{x})^2}$$

Der Korrelationskoeffizient beschreibt damit nur die lineare Abhängigkeit der beiden Merkmale x und y. Der Regressionskoeffizient besagt darüber hinaus, welcher Art diese Abhängigkeit ist. Genauer, wie ändert sich y in Abhängigkeit einer definierten Änderung von x.

2.3. Flüssigkeitsszintillationszählung

2.3.1. Prinzip

Flüssigkeitsszintillationszählung ist die bevorzugte Methode zur Zählung von Beta-Strahlung emittierenden Substanzen. Als Szintillation bezeichnet man die Lichtblitze, die beim Auftreffen von energiereicher Strahlung auf fluoreszierende Substanzen (Phosphorverbindungen) entstehen. Die Szintillationsflüssigkeit besteht im wesentlichen aus vier Bestandteilen:

- radioaktives Material
- organische Lösungsmittel
- eine oder mehrere Phosphorverbindungen (sog. Szintillatoren)
- Lösungsvermittler (Dioxan bei radioaktiven Verbindungen in wäßriger Lösung)

Die von der radioaktiven Substanz emittierte Strahlung wird durch das Lösungsmittel auf den Phosphor übertragen. Beim Durchgang durch die Phosphormoleküle werden Elektronen in einen angeregten Zustand (höheres Energieniveau) versetzt, die bei der Rückkehr in den Grundzustand Photonen bestimmter Energie emittieren. Die Lichtblitze nimmt der Photomultiplier des Zählgerätes auf und setzt sie in elektronische Impulse um.

Die Qualität des Zählgerätes wird hauptsächlich von der Effektivität, d.h. dem gezählten Prozentsatz der tatsächlichen Anzahl von Zerfällen des radioaktiven Materials (dpm) bestimmt.

$$E\ \% = \frac{cpm}{dpm} \times 100\ \%$$

2.3.2. Auslöschphänomen (quenching)

Als Auslöschen (quenching) bezeichnet man die Abnahme der Effektivität durch Prozesse, die die Entstehung von Lichtblitzen und/oder deren Übertragung auf den Photomultiplier stören. Es ist zwischen chemischem quenching und quenching durch Farbe zu unterscheiden.

a) chemisches quenching:
Substanzen der Szintillationsflüssigkeit stören die Übertragung emittierter Strahlung auf den Phosphor oder die Entstehung der Lichtblitze im Phosphor. Dies kann z.B. durch in der Szintillationsflüssigkeit gelösten Sauerstoff oder durch Ausfallen bzw. Kristallisieren von Substanzen hervorgerufen werden, was besonders leicht bei polaren Bestandteilen wäßriger Lösungen der Fall sein kann.

b) quenching durch Farbe:
Farbige Substanzen absorbieren Photonen und stören so die Aufnahme der vom Szintillator emittierten Lichtblitze durch den Photomultiplier des Zählgerätes.

2.3.3. Photolumineszenz

Da die in der Szintillatorflüssigkeit enthaltenen Phosphorverbindungen auch durch Tageslicht oder künstliches Licht zur Emission von Photonen angeregt werden können, ist es notwendig, die Proben vor dem Zählen mindestens 6 Stunden bei Dunkelheit stehen zu lassen, um Zählfehler durch Photolumineszenz zu vermeiden.

2.4. Schema des Analysenganges

EXTRAKTION

- 250 µl Plasma + 2500 dpm als interner Standard (^{3}H-Steroid in 150 µl Gammaglobulin-Borat-Puffer) ≙ 100 % Wiederfindung
- 2 x 5 ml Dichlormethan
- waschen mit 3 ml Aqua destillata
- abdampfen (im Aluminiumblock bei 40°C unter Sticksoff)

CHROMATOGRAPHIE

- auftragen in 2 x 250 µl Laufmittel auf 6 parallellaufende 60 cm Sephadex LH-20-Säulen
- Elution mit Sammeln der 3 Steroidfraktionen bzw. Eluatpool
- abdampfen (Vakuumofen bei 40°C)
- 2 ml Äthanol absolut zur Probe

WIEDERFINDUNG (2 x Aliquot)	unbekannte Probe (2 x Aliquot)	Eichreihenstandards (3 x Aliquot)
- abdampfen (Vakuumofen bei 40°C)	- abdampfen	- abdampfen
- 100 µl Gammaglobulin-Borat-Puffer		
- 10 ml BRAY-Szintillator		
- Flüssigkeitsszintillationszählung		

RADIOIMMUNOASSAY

- 100 µl ^{3}H-Steroid (≙ 5000 dpm) in Gammaglobulin-Borat-Puffer
- 500 µl Antiserum-Verdünnung
- Schüttelinkubation bei 37°C für 20 min
- Ruheinkubation bei 0°C für 2 h
- 100 µl Aktivkohle-Dextran-Suspension
- kurz mit Hand schütteln
- 15 min bei 0°C in Ruhe
- zentrifugieren bei 0°C (1500 g x 20 min)
- Überstand in 10 ml BRAY-Szintillator dekantieren
- Flüssigkeitsszintillationszählung

2.5. Extraktion der Steroide aus dem Plasma

250 - 2000 µl Plasma wurden in ein Extraktionsgefäß mit konischem Boden pipettiert. Als interner Standard der Wiederfindung kamen je 2500 dpm (4 - 6 pg, je nach spezifischer Aktivität der Charge) tritiiertes Corticosteron, Aldosteron und Cortisol dazu, jeweils gelöst in 150 µl Gammaglobulin-Borat-Puffer. Der Ansatz wurde auf dem VORTEX-Mixer 15 Sekunden gemischt und blieb zum Aquilibrieren mindestens 4 Stunden bei 4°C stehen.

	Plasma	tritiiertes Corticosteron	Aldosteron	Cortisol
Extraktionsgefäß	250-2000 µl	150 µl +	150 µl +	150 µl
Szintillations-gefäß I		150 µl	150 µl	150 µl
Szintillations-gefäß II		150 µl	150 µl	150 µl

Ist die Zeit zum Äquilibrieren von Plasma und tritiiertem Steroid zu kurz, so erhält man zu hohe Wiederfindungen an Radioaktivität (2). Die Erklärung hierfür ist die Proteinbindung der meisten Plasmasteroide. Wird die Extraktion zu früh nach Zugabe des radioaktiv markierten Steroids ausgeführt, so hat sich für die Bindung der tritiierten Substanzen an die Plasmaproteine im Austausch mit den endogenen Steroiden noch kein Gleichgewicht eingestellt. Das tritiierte Steroid ist weniger stark an das Protein gebunden und wird somit leichter extrahiert.

Parallel zum Ansatz der Proben wurden 2 x 2500 dpm je Steroid (Doppelbestimmung) in 150 µl Gammaglobulin-Borat-Puffer als 100%-Wert des internen Standards der Wiederfindung in Szintillationsgefäße, die 10 ml BRAY-Szintillator enthielten, pipettiert. Um Zählfehler zu ver-

meiden, blieben sie mindestens 6 Stunden bei Dunkelheit stehen, bevor sie im Szintillationszähler gezählt wurden.

Die äquilibrierten Proben wurden 2 x mit 5 ml kaltem Dichlormethan von Hand (wringende Bewegung) 30 Sekunden lang ausgeschüttelt. Dadurch ließ sich die Bildung von Emulsionen fast vollständig vermeiden.

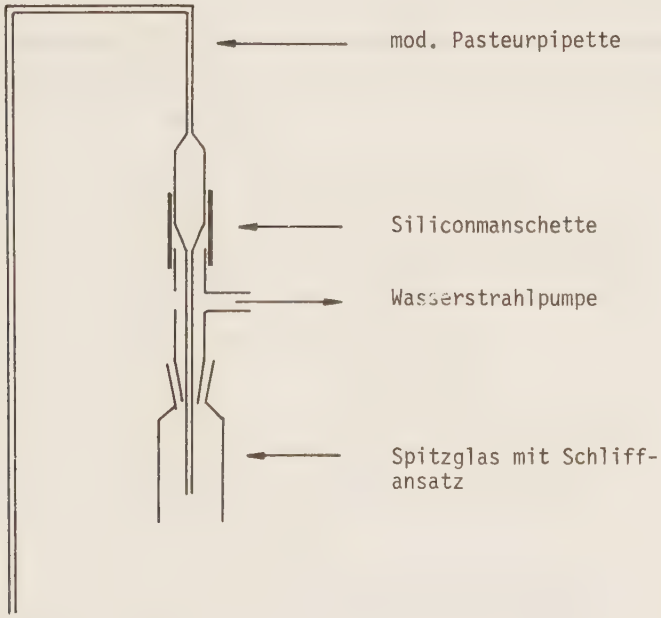


Abb. 3 Modifizierte Pasteurpipette zur Extraktion

Durch Zentrifugieren im Ausschwingrotor (2500 rpm x 5 Minuten bei 0^{oC}) stellten sich die Grenzflächen zwischen wäßriger (oben) und Lösungsmittelphase (unten) sehr rasch ein, so daß die Dichlormethanphase ohne Schwierigkeiten durch Absaugen mit einer Wasserstrahlpumpe und modifizierter Pasteurpipette (Abb. 3) in ein Spitzglas mit konischem Boden überführt werden konnte. Nach Waschen mit 3 ml destilliertem Wasser und Absaugen der wäßrigen Phase (mit modifizierter Pasteurpipette) wurden die Extrakte unter Stickstoff im Wasserbad (50^{oC}) vollständig eingeengt, in je 250 µl des Lösungsmittelsystems (Dichlormethan/Methanol = 98 / 2, v/v) wieder gelöst und standen so zur chromatographischen Trennung zur Verfügung.

2.6. Chromatographie

2.6.1. Sephadex LH-20 und seine Eigenschaften

Apathogene Bakterien der Gruppe Leuconostoc mesenteroides sind in der Lage, in Zuckerlösungen stärkeähnliche Polysaccharide, die Dextrane, zu synthetisieren. In diesen dreidimensionalen, kugelförmigen Netzwerken sind die Glucosemoleküle hauptsächlich in 1,6 - glycosidischer Bindung miteinander verknüpft. Die zahlreichen freien Hydroxylgruppen der Moleküle (markierte Sauerstoffatome in Abb. 4) verleihen dem Dextran hydrophile Eigenschaften.

1966 gelang es, durch Einführen von Hydroxypropylgruppen ($-CH_2-CH_2-CH_2-OH$) über Ätherbindungen an die freien Hydroxylgruppen der Glucosemoleküle des Sephadex G-25 ein lipophiles Dextran zu synthetisieren, das von der Firma PHARMACIA unter dem Handelsnamen Sephadex LH-20 auf den Markt gebracht wurde.

Durch diese Substitution änderte sich bei gleichbleibender Zahl der Hydroxylgruppen die der Kohlenstoffatome des Dextramoleküls. Die Zunahme des Quotienten $\frac{\text{Kohlenstoff}}{\text{- OH}}$ bedingt die lipophilen Eigenschaften und damit eine Abnahme der Polarität des Gels gegenüber Sephadex G-25. Sephadex LH-20 quillt beträchtlich in wäßrigen und in polaren organischen Lösungsmitteln, z.B. in Dichlormethan 3,6 - 3,9 ml/g trockenes Gel. Der Durchmesser der kugelförmigen Partikel des trockenen Gels beträgt 25 - 100 µ. Substanzen mit einem Molekulargewicht von mehr als 4000 werden von dem Gel ausgeschlossen, d.h. sie können aufgrund ihrer Größe nicht in die Poren des Gels eindringen (25).

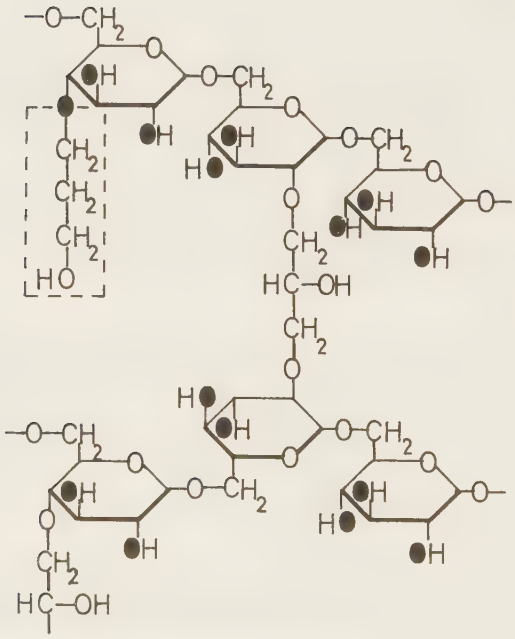


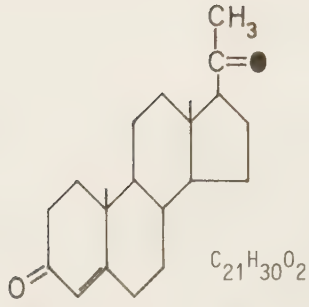
Abb. 4 Strukturformel des Dextran. Die freien Hydroxylgruppen sind markiert. Eine dieser freien Hydroxylgruppen ist entsprechend Sephadex LH-20 durch eine Hydroxypropylgruppe über Ätherbindung substituiert.

2.6.2. Trennungsmechanismen von Sephadex LH-20 bei Verwendung eines wenig polaren Laufmittels

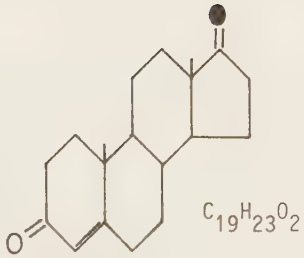
Die NNR-Steroide unterscheiden sich nur durch die Zahl und Anordnung der Hydroxyl- und Keto-Gruppen am Pregnangrundgrüst (1.2.). Die geringen Differenzen der Molekulargewichte dieser Substanzen werden fast ausschließlich durch die Anzahl dieser Gruppen bedingt (Abb. 5). Hydroxyl- sowie Keto-Gruppen sind aufgrund der unterschiedlichen Elektronegativität der Atome relativ polar. Die beste Trennung von Substanzen gleicher Größe, aber unterschiedlicher Polarität wird mit Sephadex LH-20 und halogenierten, organischen Lösungsmitteln erreicht (25). Es handelt sich dabei um eine flüssig/fest-Verteilungschromatographie mit direkten Phasen (straight phase liquid-gel partition); d.h. die stationäre Phase (Sephadex LH-20) ist vorwiegend polar, die mobile Phase (Laufmittel) vorwiegend unpolar.

Die Zugabe von 2 Volumenprozent Methanol zum Dichlormethan führt zu einer geringen Erhöhung der Polarität des Laufmittels, nicht aber zur Umkehr der beiden Phasen. Damit wird die durch Adsorption der Steroide an die stationäre Phase bedingte Verbreiterung der Basis der peaks (tailing) praktisch ausgeschlossen und eine bessere Trennung der Substanzen voneinander erreicht (25). Die Verteilung flüssig/fest und die Gelfiltration werden von ENEROTH als die Hauptmechanismen der Chromatographie auf Sephadex LH-20 angesehen. Die Elution der Substanzen erfolgt entsprechend ihrer Polarität. Eine Keto-Gruppe im Molekül führt zu einer vergleichsweise schnelleren Elution der Substanzen; ein Phänomen, das von ENEROTH und NYSTRÖM als "Ketonausschluß" bezeichnet wurde (25).

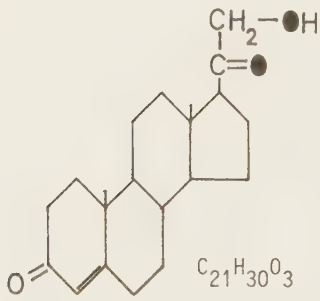
Allgemein hängt die Elutionsgeschwindigkeit einer Substanz von ihrer relativen Bindung an eine der beiden Phasen ab. Die Affinität zum Gel ist dem Elutionsvolumen direkt, die Affinität zur mobilen Phase dem Elutionsvolumen umgekehrt proportional. Die Affinität hängt von



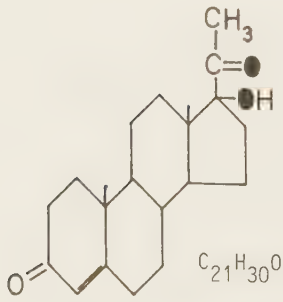
PROGESTERON MW 314



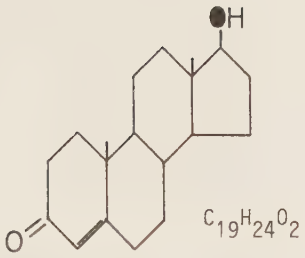
ANDROSTENDION MW 274



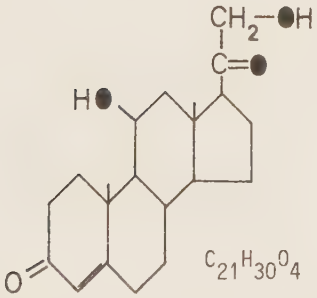
11-DEOXYCORTICOSTERON MW 330



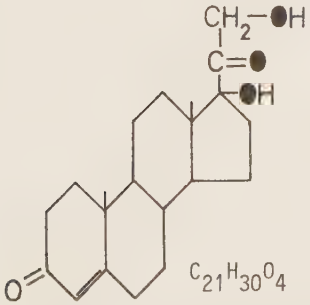
17-HYDROXYPROGESTERON MW 330



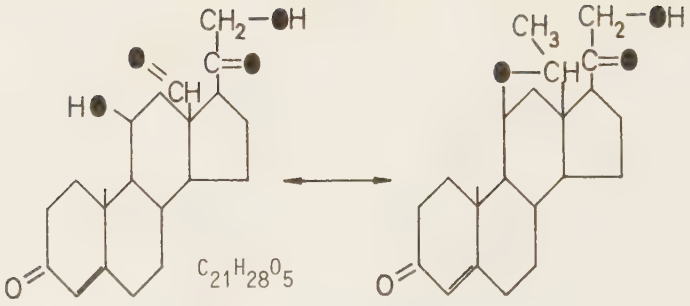
TESTOSTERON MW 300



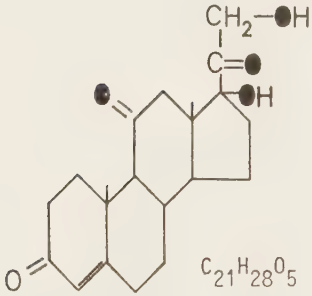
CORTICOSTERON MW 346



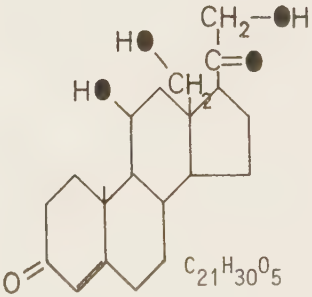
11-DEOXYCORTISOL MW 346



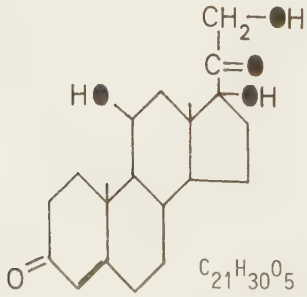
ALDOSTERON MW 360



CORTISON MW 360



18-HYDROXYCORTICOSTERON MW 362



CORTISOL MW 362

Abb. 5 Strukturformeln der NNR-Steroide in der Reihenfolge ihrer Elution auf der Sephadex LH-20-Säule mit Summenformeln und Molekulargewicht (MW).

folgenden molekularen Kräften ab:

(1) schwache Wechselwirkung zwischen allen Elektronen benachbarter Atome bzw. Moleküle
(2) Induktionseffekt: polare Substanzen bewirken eine Ladungsassymmetrie in anderen Molekülen
(3) Orientierungseffekt: gegenseitige Anziehung von Molekülen, die auf der Ausrichtung von Dipolen beruht (positive und negative Ladungen im Molekül liegen getrennt)
(4) Wasserstoffbindung: dipolare Moleküle mit positiven Wasserstoffatomen
(5) Säure-Basen-Interaktionen(LEWIS): nach LEWIS sind Basen Elektronendonatoren und Säuren Elektronenakzeptoren.

Sauerstoff besitzt eine hohe Elektronegativität. Die OH-Bindung ist daher stark polarisiert:

$$R -- O^{d^-} - H^{d^+}$$

Da das positiv geladene Wasserstoffatom sehr klein ist, können andere Moleküle so nah an das Sauerstoffatom herantreten, daß elektrostatische Anziehungskräfte zu entgegengesetzt geladenen Atomen wirksam werden. So tritt z.B. das positiv geladene Wasserstoffatom einer Hydroxylgruppe des Sephadex LH-20 Gel zum negativ geladenen Sauerstoffatom einer OH-Gruppe des Steroidmoleküls in Verbindung (sog. Wasserstoffbrücken-Bindung);

2.6.3. Berechnung von Chromatographieparametern

Um eine Aussage über die Anwendbarkeit einer chromatographischen Methode zur Trennung einer Gruppe von Substanzen machen zu können, sollen einige theoretische Betrachtungen über deren Verhalten während der Säulenpassage angestellt werden.

2.6.3.1. Verteilungskoeffizient

Substanzen, die über die stationäre Phase strömen, werden von dieser adsorbiert und zwar jede in einem Ausmaß, das vom Verteilungskoeffizienten (K) für das System abhängt. Das NERSTsche Gesetz besagt, daß das Verhältnis der Konzentration eines sich zwischen zwei Phasen verteilenden Stoffes im Gleichgewichtszustand bei gegebener Temperatur konstant ist. Die Konstante wird als Verteilungskoeffizient (K) bezeichnet. Bezogen auf die Chromatographie mit lipophilen Sephadex-Derivaten errechnet sich nach ENEROTH der Verteilungskoeffizient aus folgender Gleichung (25):

$$K = \frac{V_e - V_o}{V_{total} - (V_{Gel} + V_o)}$$

V_e: Elutionsvolumen

V_o: Elutionsvolumen einer Substanz, die ganz vom Gel ausgeschlossen wird (MW größer 4000)

V_{total}: Volumen des Gelbettes

V_{Gel}: Volumen der Gelmatrix

In dieser Gleichung entspricht $(V_e - V_o)$ der mobilen Phase und $V_{total} - (V_{Gel} + V_o)$ der stationären Phase. Bei Verwendung von Sephadex LH-20 und halogenierten Kohlenwasserstoffen als Eluens entspricht V_o etwa 30% des Gelbettes (59,62).

2.6.3.2. Quantitative Trennung zweier Substanzen

Die quantitative Trennung (resolution) von Substanzen ist das entscheidende Kriterium eines Chromatographiesystems (46). Ein Maß dafür ist der Trennungskoeffizient (resolution factor) R_s:

$$R_s = \frac{V_{e2} - V_{e1}}{2(s_1 + s_2)}$$

Diese Gleichung ergibt sich aus folgenden theoretischen Betrachtungen über die Verteilungschromatographie.

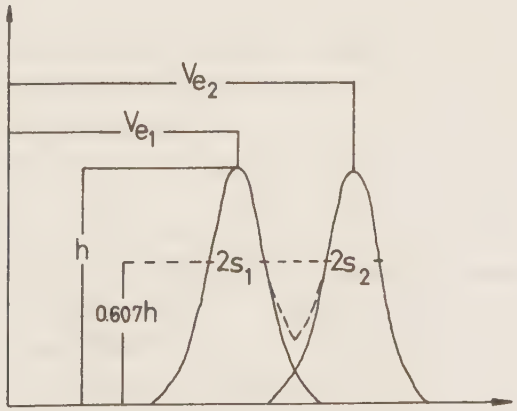


Abb. 6 Bestimmung des Trennungskoeffizienten R_s für zwei nahe beieinanderliegende Banden. Für dieses Beispiel gilt $R_s = 1$.

2.6.3.3. Theoretische Böden

Das Konzept der theoretischen Böden ("theoretical plates") wurde von MARTIN und SYNGE aufgestellt.

Ziel dieses Konzeptes ist es, die Adsorptions-Desorptions-Zyklen eines Moleküls auf seinem Weg durch die Säule zu beschreiben. Die Anzahl der theoretischen Böden errechnet sich wie folgt:

$$N = \left(\frac{V_e}{s}\right)^2$$

N wird auch als Säuleneffektivität (columm efficiency) bezeichnet.

Dabei ist die Zahl der theoretischen Böden (N) gleich der Zahl der Adsorptions-Desorptions-Zyklen eines Moleküls auf seinem Weg durch die Säule. Je größer N, desto breiter ist der Peak. Die Anzahl der theoretischen Böden wird durch die Art und Größe des Adsorbens, die Art und Flußrate des Eluens und die Dimension der Säule beeinflußt (62).

2.6.4. Reproduzierbarkeit der Chromatographie

Sephadex LH-20 Säulen lassen sich ohne Reinigung des Gels und neues Packen über längeren Zeitraum verwenden, wenn sie nach jeder Chromatographie mit Laufmittel gespült werden (47, 48). Dadurch ist die Möglichkeit der Mechanisierung gegeben.

Die Reproduzierbarkeit beschreibt die Abweichung der Elutionsmuster einer sowie mehrerer Säulen bei der Verwendung über einen längeren Zeitraum ohne erneutes Packen. Sie stellt damit die wichtigtste Voraussetzung der Machanisierung dar. Die Reproduzierbarkeit der Elutionsmuster ist im wesentlichen von der Umgebungstemperatur und der konstanten Flußrate des Laufmittels abhängig (47, 48).

Durch einfache Fensterklimageräte wurde die Raumtemperatur zwischen 18^{oC} und 20^{oC} gehalten. Die Flußrate konnte durch Mikroflowmeter kontrolliert und bei Bedarf durch Feinregulierventile neu eingestellt werden (Abb. 7).

Unter der Voraussetzung, daß gereinigte, tritiierte Steroide und gleichmäßig reine Laufmittel zur Anwendung kommen, kann die Konstanz (Reproduzierbarkeit) der Wiederfindung als Zeichen der Reproduzierbarkeit der Chromatographie gewertet werden.

2.6.5. Packen und Aufbewahren der Säulen

Pro Säule wurden 15 g trockenes Sephadex LH-20 Gel in einem ERLENMEYER-Kolben mit etwa 100 ml Laufmittel versetzt. Nach mehrmaligem guten Mischen blieb der Ansatz verschlossen über Nacht bei 4^{oC} zum Quellen stehen. Die Gelsuspension wurde in kleinen Portionen in die zu einem Viertel mit Laufmittel gefüllte Säule gegossen. Bei freiem Durchfluß des Laufmittels durch die Säule setzte sich das Gel gleichmäßig ab. Auf diese Weise war es möglich, innerhalb einer Stunde sechs Säulen gleichzeitig bis zu einer Höhe von 60 cm zu packen.

Das spezifische Gewicht von Sephadex LH-20 ist kleiner als das von Dichlormethan. Ein Laufmittelüberstand in der gepackten Säule führt deshalb dazu, daß das Gel an die Oberfläche schwebt und sich die Säule auflockert. Der Versuch, dies durch eine poröse Teflonmembran auf der Geloberfläche zu verhindern, hat sich in erster Linie wegen der ungenügenden Randabdichtung nicht bewährt. Darüber hinaus ändert sich durch einen Laufmittelüberstand der hydrostatische Druck und damit die Flußrate. Das Problem konnte jedoch dadurch gelöst werden, daß mit einer exakt regulierbaren Peristaltikpumpe gerade soviel Laufmittel aufgegeben wurde, daß die Säule nicht austrocknete, sich aber auch kein Überstand bildete.

Mit einem mit einer Teflonmanschette abgedichteten Glasschliffkolben am oberen Ende und mit einem Teflonhahn am unteren Ende verschlossen, konnten die Säulen bis zu 14 Tage ohne Austrocknen des Gels aufbewahrt werden. Bei Bedarf wurden kleine Mengen des Laufmittels (maximal 1 ml) auf die Geloberfläche aufgegeben. Luftblasen in der Säule ließen sich durch vorsichtiges Klopfen oder Vibrieren problemlos aus der Säule entfernen. Vor der ersten Chromatographie nach dem Packen bzw. nach längerer Aufbewahrungszeit wurden die Säulen etwa eine Stunde vor dem Auftragen mit reinem Laufmittel gespült.

Das Spülen mit 60 ml Laufmittel nach jeder Chromatographie diente dazu, Verunreinigungen bei der nachfolgenden Elution zu vermeiden. Bei mehrfachen Kontrollen während des Spülens konnte keine Radioaktivität im Eluat nachgewiesen werden. Deshalb wurde aus diesem Eluat das Laufmittel für den Ansatz der Standardkurven gewonnen (2.4.7., 2.7.7.).

2.6.6. Erstellung der Elutionsmuster der 60 cm Sephadex LH-20 Säule mit Hilfe von tritiierten Steroiden

Etwa 3000 cpm eines tritiierten Steroids, gelöst in 150 µl der Stammlösung (Benzol:Äthanol = 9:1), wurden in ein Spitzglas pipettiert und unter konstantem Stickstoffstrom im Aluminiumblock abgedampft, der Rückstand in 1,2 ml des Laufmittels (Dichlormethan:Methanol = 98:2, v/v) wieder gelöst. 500 µl davon wurden als 100%-Wert des internen Standards in kleine Szintillationsgefäße (sog. minivials), die 5 ml Toluolszintillator enthielten, pipettiert. Weitere 500 µl des Laufmittels dienten der Quenchkorrektur der 100%-Werte, da das Probenvolumen 1 ml betrug. Ferner wurden 500 µl des Laufmittels mit tritiierten Steroiden mittels einer Eppendorf-Pipette vorsichtig auf die eben trockene Geloberfläche der Säulen aufgetragen und bei konstanter Flußrate von 40 ml/h eluiert.

Durch Verwendung von 1,2 ml statt 1 ml Laufmittel beim Lösen des abgedampften Rückstandes der tritiierten Steroide wurde eine größere Genauigkeit zwischen 100%-Wert des internen Standards und den Proben erreicht. Die einzelnen Fraktionen (1 ml) wurden im linearen Fraktionssammler bei 4^{oC} in sog. minivials, die je 5 ml Toluolszintillator enthielten, gesammelt. Alle Proben blieben einige Stunden bei Dunkelheit stehen bevor sie gezählt wurden, um Zählfehler durch Photolumineszenz zu vermeiden (2.3.5.).

Bei der Erstellung der Elutionsmuster kann der sonst verwendete BRAY-Szintillator durch den rentableren Toluol-Szintillator ersetzt werden, da die Proben keine wäßrigen Bestandteile enthalten.

2.6.7. Berechnung der Wiederfindung

Von den einzelnen Probenwerten der gesammelten Fraktionen und dem 100%-Wert des internen Standards wurde der Background des Flüssigkeitsszintillationszählgerätes subtrahiert. Aus den Netto-cpm-Werten errechnet sich die Wiederfindung (y) nach folgender Gleichung:

$$y\ (\%) = \frac{\text{Summe der Nettoprobenwerte x 100}}{\text{interner Standard (100\%-Wert)}}$$

2.6.8. Aufbau der mechanisierten Chromatographieanlage

Auf 6 parallellaufenden Säulen konnten 6 Plasmaextrakte gleichzeitig aufgetrennt werden (Abb. 7).

Aus dem Reservoir (1) wurde über 6 parallele Teflon- bzw. Viton-Schläuche mit einer regulierbaren Peristaltikpumpe (2) das Eluens auf die Säulen (3) aufgebracht. Die weicheren Vitonschläuche fanden im Bereich der Peristaltikpumpe Verwendung. Über ein nachträglich in die Pumpe eingebautes Mikropotentiometer konnte der Zufluß des Laufmittels exakt der Flußrate der Säulen angepaßt werden, so daß kein Überstand auf der Geloberfläche entstand und die Säulen nicht austrockneten (2.6.5.). Um das Verdampfen von Eluens an der Geloberfläche zu vermeiden, wurde das zuführende Ende des Teflonschlauches

durch einen PVC-Stopfen geführt, der das Schliffende der Säule verschloß. Mit Mikroflowmetern (6), die nach dem Auftriebsprinzip arbeiteten, wurde die Flußrate von 40 ml/h kontrolliert. Etwaige, während der Elution auftretende Unregelmäßigkeiten der Flußrate konnten mit den am unteren Ende der Säule angeschmolzenen Feinregulierventilen (4) ausgeglichen werden. Hinter den Ventilen bildeten sich gelegentlich im abführenden System Blasen, die die Flowmeter empfindlich störten. Deshalb wurde zwischen Ventil und Flowmeter eine eigens entwickelte Mikroblasenfalle eingeschmolzen, die vor Beginn der Elution entlüftet wurde.

Die Volumensteuerung des Fraktionssammlers erfolgte über einen 1 ml Glassiphon, in den der abführende Teflonschlauch einer der 6 Säulen mündete und der infolge der niedrigen Viskosität des verwendeten Laufmittels sehr exakt und reproduzierbar arbeitete. Die übrigen 5 Säulen tropften am distalen Ende frei ab. Mit jedem Abheben des Siphon erhielt das Steuergerät STZ einen Impuls über den abführenden Schenkel des Siphon von der Lichtschranke, der an den Programmer (9) weitergegeben wurde und dessen Lochstreifen bewegte.

Wegen des geringen Durchmessers (ID 0,5 mm) des der Säule nachgeschalteten Teflonschlauches war ein erneutes Vermischen der von einander getrennten Substanzen nach der Chromatographie nicht möglich. Das Volumen des abführenden Systems zwischen Fritte der Säule und Siphon betrug 1,2 ml.

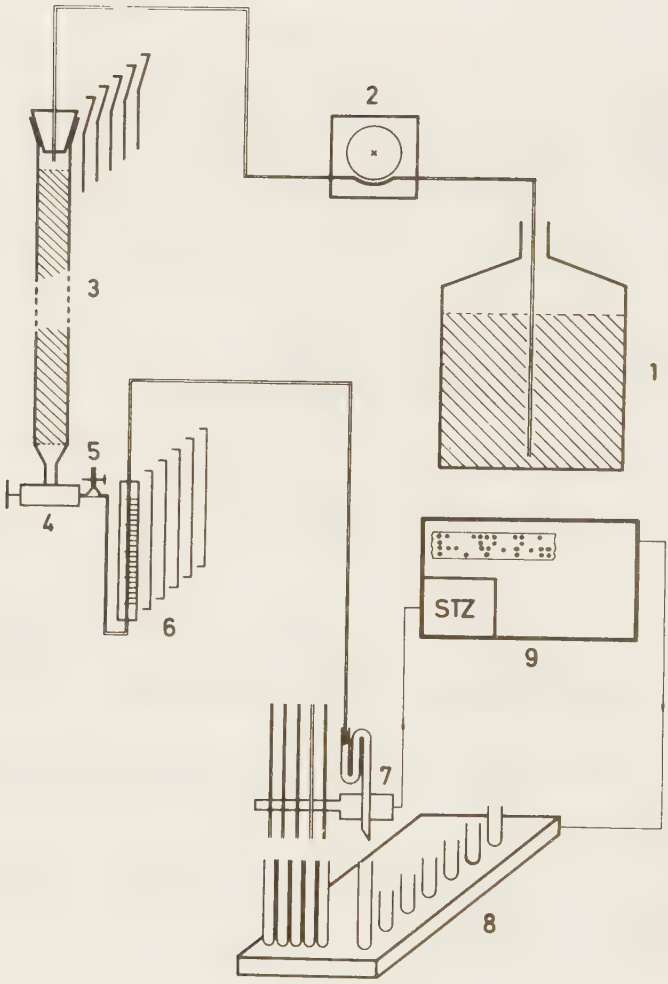


Abb. 7 Schema der Versuchsanordnung der mechanisierten Chromatographie

(1) Laufmittelreservoir, (2) Peristaltikpumpe, (3) Säulen, (4) Feinregulierventile, (5) Blasenfalle, (6) Flowmeter, (7) Siphon mit Lichtschranke, (8) linearer Fraktionssammler, (9) Programmer und Steuereinheit STZ

2.6.9. Technische Besonderheiten bei der mechanisierten Chromatographie

Um die Zeit für das Auftragen der Plasmaextrakte auf die 6 parallelen Säulen so gering wie möglich zu halten, wurde zum Auftragen statt der Eppendorf-Pipette 1 ml Glasspritzen verwendet, in die bereits vorher der aufzutragende Plasmaextrakt von 500 µl aufgezogen wurde. Die Dauer für das Auftragen auf die 6 Säulen mit einmaligem Nachspülen und sorgfältigem Nachspülen an der Auftragungsstelle an der Glaswand direkt oberhalb der Geloberfläche betrug maximal 90 Sekunden. Dies entspricht der Zeit für die Füllung des Siphons am Fraktionssammler.

2.7. RADIOIMMUNOASSAY

2.7.1. Das Prinzip des Radioimmunoassay (RIA)

Der Radioimmunoassay (RIA) ist eine Form der kompetitiven Proteinbindungsanalyse, die wiederum in die Gruppe der Sättigungsanalysen gehört. In Tab. 1 sind die unterschiedlichen Methoden der Sättigungsanalysen und deren gängige Nomenklatur aufgetragen.

Eiweißmoleküle, die bei der kompetitiven Proteinbindungsanalyse Verwendung finden:

(1) spezifische Transport- oder Carrier-Proteine
(2) Proteine aus Drüsen, wenn Drüsen die Erfolgsorgane der zu messenden Substanz sind
(3) Enzyme (Radioenzymassay)
(4) Antikörper aus der Gruppe der Gammaglobuline (Radioimmunoassay)

Wichtigste Voraussetzung dieser Methode ist, daß sich endogene und radioaktiv markierte Substanzen in ihren Bindungseigenschaften an die Proteine nicht unterscheiden. Dies ist bei tritiierten und ^{14}C-markierten Steroiden der Fall (20). Der große Vorteil des RIA ist die bereits anfangs erwähnte hohe Empfindlichkeit dieser Technik, die Messungen im Picogrammbereich (1 pg = 10^{-12} g) ermöglicht.

Die Bindung an den Antikörper stellt chemisch betrachtet eine Gleichgewichtsreaktion dar, die nach dem Massenwirkungsgesetz abläuft (Abb. 8). Endogenes und radioaktiv markiertes Steroid konkurrieren im Sinn der kompetitiven Hemmung um die Bindungsstellen des Antiserums. Mathematischer Ausdruck dieser Reaktion ist die Abnahme der Bindungsprozente (d(B/F)) bei definierter Zunahme der Menge an nicht

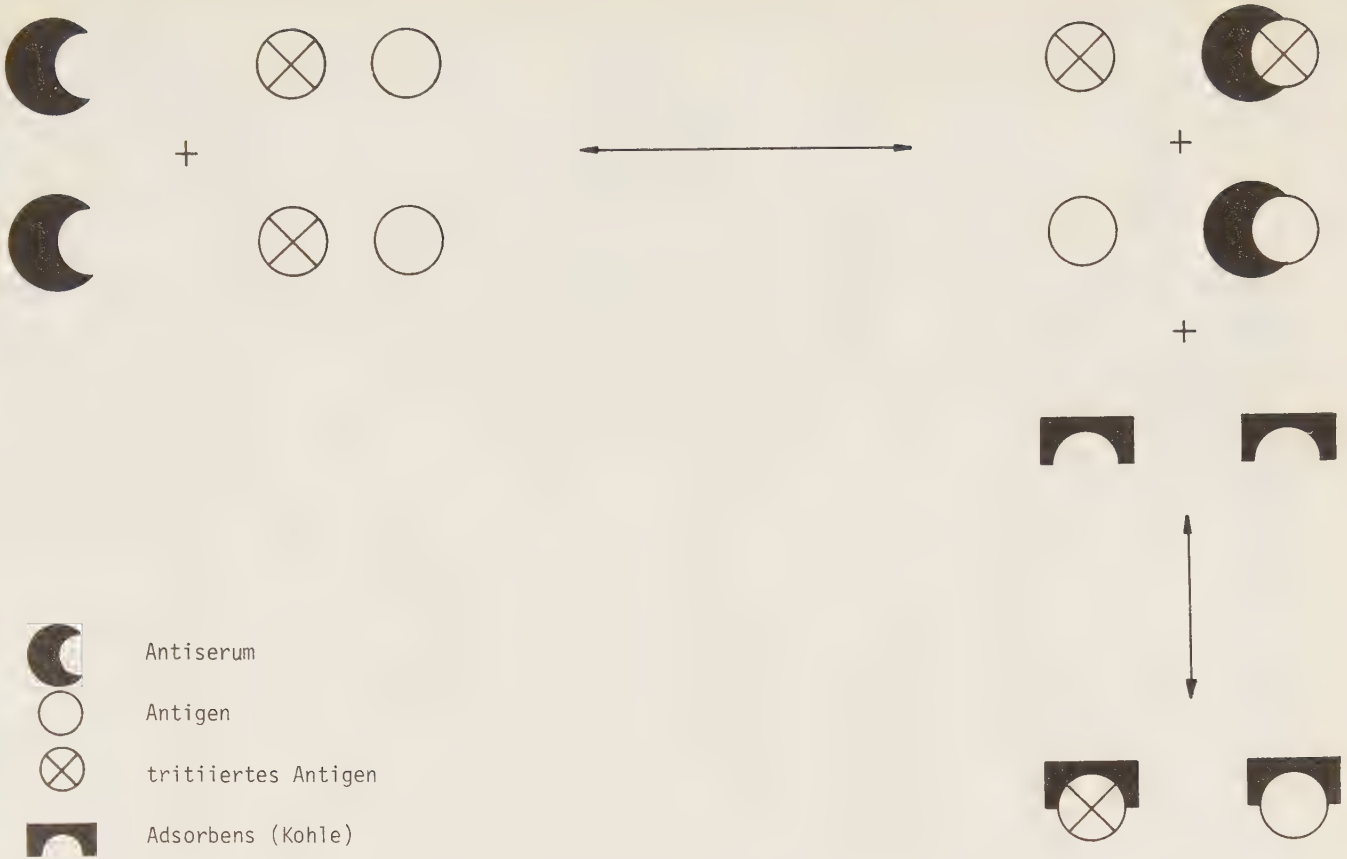


Abb. 8 Prinzip des Radioimmunoassay

SÄTTIGUNGSANALYSEN
(Verdrängungsanalysen)

markierte und endogene Substanzen konkurrieren um die Bindungsstellen eines Proteins

die Spezifität ist von den Bindungsstellen des Proteins unabhängig (unspez. Carrier)

Assay mit radioaktiven Verbindungen (Proteine oder Gelatine; radioaktive Substanzen als "tracer")

KOMPETITIVE PROTEINBINDUNG
(die Spezifität ist wesentlich von den Bindungseigenschaften des Proteins abhängig)

RADIOIMMUNOASSAY

Protein = Antikörper

RADIOENZYMASSAY

Protein = Enzym

Tab. 1 Nomenklatur der Sättingungsanalysen

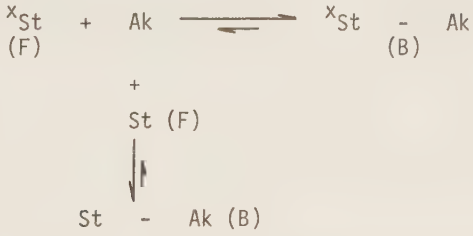
markiertem Steroid (d(St)) (11). Sie wird durch folgende Differentialgleichung beschreiben:

$$\frac{d(B/F)}{d(St)} \qquad (2.7.2.)$$

Bei dieser Arbeit fanden tritiierte Steroide und Antiseren von Hasen Verwendung. Die Trennung der freien von den antikörpergebundenen Steroiden erfolgte mit einer Aktivkohle-Dextran-Suspension.

2.7.2. Standardkurven

Die Standard- oder Eichkurve ist das graphische Bild der Dosis-Wirkungs-Beziehung und beschreibt die nach dem Massenwirkungsgesetz ablaufende Gleichgewichtsreaktion der Bindung des Antigens (St, ^{x}St) an den Antikörper (Ak). Biochemisch folgt sie dem Prinzip der kompetitiven Hemmung.



F freie Substanz

B antikörpergebundene Substanz

Aufgetragen werden die gemessene Radioaktivität (cpm) bzw. die Bindungsprozent (B/F) gegen die definierte eingesetzte Menge des endogenen Steroids (pg). Dadurch erhält man die hyperbolische Standardkurve. Durch entsprechende mathematische Transformation (z.B. logit-log) läßt sich für einen bestimmten Meßbereich eine annähernde Linearisierung erreichen (2.9., 4.5.). Die Standardkurve wird durch folgende Exponentialfunktion beschrieben:

$$\frac{d(B/F)}{d(St)} \qquad (2.7.1.)$$

Entsprechend der Definition des BRITISH STANDARD INSTITUTE (BSI) ist die Empfindlichkeit der Standardkurve durch die Änderung der Bindungsprozent (d(B/F)) bei definierter Änderung der Menge der physiologischen Substanz d(St) bestimmt. Hieraus ergibt sich, daß die Empfindlichkeit der Standardkurve um so besser ist, je größer die Abnahme der prozentualen Bindung (d(B/F)) bei gegebener Zunahme der Menge des endogenen Steroids d(St) ist (11). Eine quantitative Aussage, d.h. über die kleinste meßbare Menge ist damit jedoch nicht möglich. Da die Änderung der Bindungsprozent bei definierter Änderung des physiologischen Steroids nicht konstant und damit linear ist (Exponentialfunktion!) ergeben sich unterschiedliche Fehler beim Ablesen in verschiedenen Bereichen der Standardkurve. Dieser Meßfehler ist um so größer, je flacher der Kurvenverlauf ist. Mathematisch wird diese Tatsache durch die folgende Differentialgleichung beschrieben (11):

$$\frac{d(B/F)}{d(St)/(St)}$$

Die Genauigkeit ist um so größer, je größer die Änderung der Bindungsprozente bezogen auf den Quotienten aus definierter Änderung der Konzentration der endogenen Substanz und der Konzentration dieser Substanz ist.

Um exakt gleiche Bedingungen für die Standardkurve und die Proben zu erhalten, muß in jedem Assay eine Eichkurve mitbestimmt werden. Dabei sollten die Eichwerte mindestens doppelt, besser dreifach eingesetzt werden.

2.7.3. Charakterisierung der Steroid-Antiseren

Jeder höher entwickelte Organismus ist in der Lage, auf körperfremde Substanzen mit einer gezielten körpereigenen Abwehr zu reagieren. Zwei Systeme stehen dazu zur Verfügung:

(1) zelluläre Abwehr: Lymphozyten
(2) humorale Abwehr: spezifische, im Blut zirkulierende Antikörper (Immunglobuline)

Die Fähigkeit einer Substanz, dieses System zu stimulieren (antigene Wirkung), ist von der Art und Größe des Moleküls dieser Substanz abhängig. Proteine besitzen die stärksten antigenen Eigenschaften. Steroide hingegen sind selbst nicht antigen wirksam.

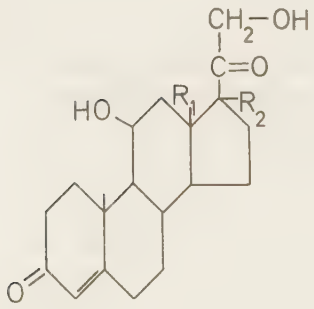
2.7.3.1. Steroid-Albumin-Konjugate

Steroide besitzen aufgrund ihrer Größe und Struktur keine antigenen Eigenschaften. ERLANGER und BEISER beschrieben 1957 und 1959 erstmals die antigene Wirkung dieser Substanzen nach kovalenter Bindung an Proteine.

Steroid	+	Albumin	⟶	Steroid-Konjugat
(Hapten)		(Träger)		(Antigen)

Diese Antikörper sind besonders spezifisch für denjenigen Teil des Steroids, der seiner Anheftungsstelle an das Eiweißmolekül am weitesten entfernt ist, denn hier ist der sterische Einfluß des Trägerproteins am geringsten (5). Es scheint darüber hinaus möglich, diesen sterischen Einfluß des Trägeralbumins durch Verlängerung der Brücke zwischen Steroid und Eiweißmolekül zu vermindern und so die Spezifität des Antiserums noch weiter zu vergrößern (5).

Die Nebennierenrindensteroide (NNR-Steroide) unterscheiden sich durch die funktionellen Hydroxyl- bzw. Keto-Gruppen an den Ringen C und D des Pregnangrundgerüstes (1.2.).



STEROIDE	R_1	R_2
Corticosteron	$-CH_3$	-H
Aldosteron	-CHO	-H
Cortisol	$-CH_3$	-OH

Abb. 9 In Lösung steht die Aldehydgruppe (R_1) von Aldosteron über eine Hemiacetalbrücke mit der Hydroxylgruppe an C_{11} in Verbindung

Als geeignetste Stelle für die Kopplung an das Protein bietet sich deshalb die Ketogruppe am C_3-Atom an, die allerdings technisch einige Schwierigkeiten bereitet (5).

Den Antiseren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, lag ein Aldosteron-C_{21}-Konjugat bzw. ein Cortisol-C_{21}-Konjugat zugrunde.

2.7.3.2. Titer von Antiseren

Der Titer dient dem Vergleich verschiedener Antiseren bzw. der Kontrolle der Antikörperspiegel eines Tieres.

Unterschiedliche Antiserumverdünnungen werden mit einer konstanten Menge radioaktiver Substanz in konstantem Testvolumen bei konstanter Temperatur eine konstante Zeit lang inkubiert. Diejenige Antiserumverdünnung, die unter diesen Bedingungen 50% des radioaktiven Steroids bindet, wird als Titer bezeichnet. Um eine zuverlässige Aussage machen zu können,muß die gleiche Methode zur Trennung des freien vom antikörpergebundenen Steroid verwendet werden (4.3.2.). Stehen mehrere Antiseren zur Verfügung, so findet in der Regel das mit dem höchsten Titer Verwendung.

Der Titer ist dem Produkt K_a(Ab) proportional, d.h. dem Produkt aus der Affinitätskonstanten K_a (l/mol) und der molaren Konzentration der freien Antikörperbindungsstellen Ab (mol/l) - freie Antikörperkonzentration (3). Daraus ergibt sich, daß keine direkte Beziehung zwischen Titer und Antiserumkonzentration besteht. Ebenso kann mit dem Titer keine Aussage über die Spezifität des Antiserums gemacht werden.

2.7.3.3. Affinität eines Antiserums

Die Affinität eines Antiserums bestimmt die Empfindlichkeit des RIA und damit die kleinste meßbare Menge. Sie ist durch die Affinitätskonstante (K_a) gegeben, die sich aus dem MICHAELIS-MENTEN-Diagramm errechnen läßt. In diesem Diagramm ist in doppelt logaritmischem Maßstab die eingesetzte Menge einer Substanz gegen deren antikörpergebundene Menge aufgetragen (Abb. 10).

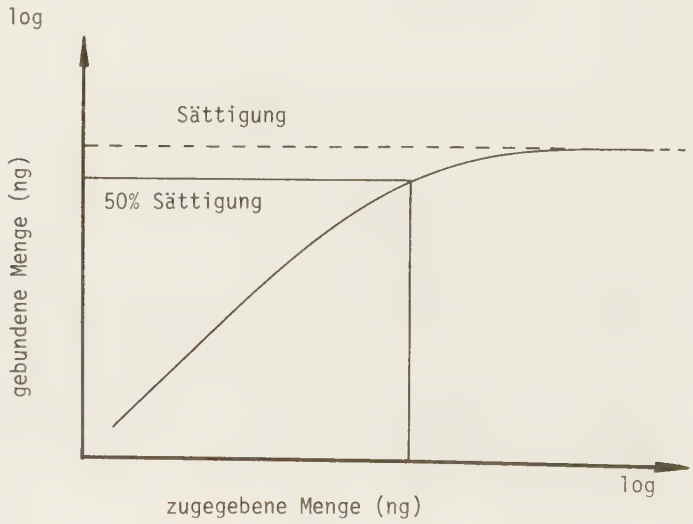


Abb. 10 MICHAELIS-MENTEN-Diagramm zur Berechnung der Affinitätskonstanten eines Antiserums.

Danach ist die Affinitätskonstante (K_a) definiert als die molare Konzentration einer Substanz bei Halbsättigung des Antiserums.

$$K_a = \frac{1}{\text{molare Konz. bei 50\% Sättigung der Bindungsstellen des AK}} \qquad (\frac{1}{mol})$$

Mit Hilfe der Affinitätskonstanten (K_a) läßt sich die mit diesem Antiserum theoretisch errechenbare Empfindlichkeit des RIA (S_{th}) nach folgender Gleichung berechnen (52):

$$S_{th} = \frac{0,1}{K_a} \qquad (\frac{mol}{l})$$

Weiter besteht eine Beziehung zwischen K_a und dem Blank des RIA. Er ist der Affinitätskonstanten umgekehrt proportional (2.7.6.2.).

Als Antiseren gegen Steroide werden im allgemeinen entsprechende Verdünnungen (2.7.3.2.) von Plasmen immunisierter Tiere verwendet. Diese sind heterogen und enthalten verschiedene Immunglobuline unterschiedlicher Konzentration, Affinität und Spezifität. Deshalb ist die Affinitätskonstante (K_a) ein Durchschnittswert, der bei Verwendung einer Kohle-Dextran-Suspension zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Steroid am stärksten von der Immunglobulinfraktion mit dem größten K_a (Ab)-Wert beeinflußt wird (2.7.3.2.). Da aber Antikörper mit dem größten K_a(Ab)-Wert nicht immer die höchste Affinität und Spezifität aufweisen, kann unter Umständen die Fraktionierung des Antiserums sinnvoll sein (1). DiPIETRO hat eine solche Trennung durch Chromatographie mit QAE-Sephadex beschrieben (20).

Auf die Berechnung der Affinitätskonstanten wurde in dieser Arbeit verzichtet, da pro Steroid nur ein Antiserum in zunächst sehr begrenzter Menge zur Verfügung stand.

2.7.3.4. Spezifität und Kreuzreaktionen eines Antiserums

Das Ausmaß der Kreuzreaktionen eines Antiserums mit anderen Steroiden ist das Maß für dessen Spezifität. Die Kreuzreaktion (C%) ist definiert:

$$C\% = \frac{A_{50\%}}{B_{50\%}} \times 100$$

$A_{50\%}$: Menge an nicht markierter Substanz A, die 50% der radioaktiven Substanz A aus der Bindung an den Antikörper verdrängen kann

$B_{50\%}$: Menge an nicht markierter Substanz B, die 50% der radioaktiven Substanz A aus der Bindung an den Antikörper verdrängen kann

Bei vergleichenden Untersuchungen müssen dieselben Voraussetzungen wie bei der Bestimmung des Titers erfüllt sein: konstante Menge radioaktiver Substanz in konstantem Assayvolumen, konstante Temperatur, konstante Inkubationszeit und dieselbe Methode zur Trennung des freien vom antikörpergebundenen Steroid (2.7.3.2.).

2.7.4. Bestimmung der praktikablen Inkubationszeit des Aldosteron-RIA

Unter dem Gesichtspunkt einer möglichst weiten und effektiven Anwendung dieser Methode in der Routine sollte der Analysengang weitgehend begrenzt werden. Biochemische Gleichgewichtsreaktionen sind in aller Regel nicht linear, sondern exponentiell. Dies gilt auch für die nach den Gesetzen der Dosis-Wirkungs-Beziehung ablaufende

Bindung des Antigens an den Antikörper. Damit ergibt sich eine starke Zunahme der Bindungsrate an das Antiserum zu Beginn der Reaktionszeit, die im Laufe der Zeit immer mehr abnimmt und sich asymptotisch einem Maximum nähert.

Entsprechend dem normalen RIA-Ansatz, jedoch ohne endogene Substanz, wurden definierte Mengen tritiierter Steroide mit konstanter Menge der Antiserumverdünnung unterschiedlich lange unter Routinebedingungen des RIA angesetzt. Nach Ablauf der Schüttelinkubation bei 37^{oC} fand zur Stabilisierung der Bindung eine Ruheinkubation bei 0^{oC} für 2 Stunden im Eis-Wasser-Bad statt. Das freie Steroid wurde durch die Aktivkohle-Dextran-Suspension adsorbiert und die antikörpergebundene Radioaktivität durch einfaches Dekantieren in die Zählgefäße überführt (2.7.7.).

Die graphische Darstellung der Reaktion erfolgt durch Auftragen der gebundenen Radioaktivität (cpm) bzw. der Bindungsprozent gegen die Inkubationszeit.

2.7.5. Aktivkohle-Dextran-Suspension. Die Trennung von freiem und antikörpergebundenem Steroid

Nach der Inkubation hat sich im Sinne der kompetitiven Hemmung zwischen endogenem und radioaktiv markiertem Steroid ein Gleichgewicht an den Bindungsstellen des Antiserums eingestellt (2.7.1.). Die Trennung des freien vom antikörpergebundenen Steroid ist aus zwei Gründen notwendig:

(1) die überschüssige Radioaktivität muß aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden

(2) Die Entfernung des freien Steroids - sowohl des endogenen als auch des radioaktiven - dient der Stabilisierung des Gleichgewichtes.

Erst nachdem die freie, im Überschuß zugegebene radioaktive Substanz entfernt ist, kann die antikörpergebundene Radioaktivität gezählt und somit über die Standardkurve auf die Menge der endogenen Substanz Rückschluß gezogen werden.

Prinzipiell stehen zwei unterschiedliche Verfahren zur Verfügung:

(1) Adsorption der Antiserumkomplexe an Festkörper (Polystyrol, Polypropylen) oder Präzipitation (mittels Amoniumsulfat, Polyäthylenglycol, 2. Antikörper) und Auswaschen bzw. Dekantieren der überschüssigen freien Substanzen
(2) Adsorption der freien Substanzen und Dekantieren der Lösung mit den Antiserumkomplexen.

Dieser Schritt begrenzt die Zahl der Proben, die pro Zeiteinheit im RIA verarbeitet werden können und stellt damit das wichtigste Kriterium der Praktikabilität und Kosten der Methode dar. In der Tab. 2 sind die zur Zeit verwendeten Verfahren und die Häufigkeit ihrer Anwendung aufgeführt (52).

In dieser Arbeit fand die am häufigsten verwendete Technik der Adsorption der freien Steroide an eine Aktivkohle-Dextran-Suspension Verwendung, die von HERBERT et al. 1965 erstmals beschrieben wurde (30). Sie besitzt gegenüber den anderen Techniken entscheidende Vorteile (4.3.2.).

Adsorption des freien Steroids	
- Aktivkohle-Dextran-Suspension	64 %
- Aktivkohle-Hämoglobin-Suspension	2 %
- Florisil	2 %
Präzipitation der gebundenen Fraktion	
- Amoniumsulfat	16 %
Immunologische Präzipitation	
- Doppelantikörper	5 %
Festkörperverfahren	
- Adsorption an die Wand der Teströhrchen (Polystyrol oder Polypropylen)	3 %
- Antikörper in Polyacrylamid-Gel	6 %
Toluolextraktion des freien Steroids	2 %

Tab. 2 Methoden der Trennung von freiem und antikörpergebundenem Steroid. Daten aus 70 zufällig ausgewählten Arbeiten von 1968 - 1974 (52).

Die Adsorption an die Kohle ist ebenfalls eine Gleichgewichtsreaktion, die in erster Linie von der Konzentration des Adsorbens abhängt, hingegen praktisch zeitunabhängig ist (53). Das Dextran dient dabei der Stabilisierung der Aktivkohle in der Lösung. Substanzen mit kleinem Molekulargewicht werden schneller adsorbiert, da sie leichter durch die Poren des Dextran an die Aktivkohle gelangen. Die Adsorptionsrate kann durch Vergrößerung der Menge des Adsorbens verbessert werden (53). Nach 15 Minuten hat die Bindung ihr Maximum erreicht, so daß längere Reaktionszeiten keine weiteren Vorteile bringen. KATZ konnte zeigen, daß es 20 Minuten nach Zugabe der Kohle zu einer Adsorption der Antikörperkomplexe kommt (35). Daraus ergibt sich eine optimale Reaktionszeit von 15 Minuten. Darüber hinaus ist die Gleichgewichtsreaktion temperaturabhängig.

Der einfacheren Technik wegen wurde diese Reaktion in dieser Arbeit im Anschluß an die Ruheinkubation bei 0^{oC} im Eis-Wasser-Bad durchgeführt. Die Reaktionszeit wurde durch Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge (4^{oC}) begrenzt und die Antikörperkomplexe durch einfaches Dekantieren in die Szintillationsflüssigkeit überführt.

2.7.6. Qualitätsmerkmale des Radioimmunoassay

2.7.6.1. Spezifität des Radioimmunoassay

Die Spezifität des RIA wird auf verschiedene Weise definiert:

(1) Auflösungsvermögen der Chromatographie
Nach der Chromatographie befinden sich in der Fraktion der zu messenden Proben keine anderen Hormone, die mit dem Antiserum nennenswert interferieren können

(2) Kreuzreaktionen der Antiseren
Sind in der Probe noch weitere Substanzen vorhanden, so dürfen sie keine signifikante Konzentration mit dem Antiserum zeigen, bzw. ihre Konzentrationen im Plasma müssen vernachlässigbar klein gegenüber derjenigen der zu messenden Substanz sein (1, 52).

(3) Die mit dem RIA gemessenen Plasmaspiegel müssen gut mit denen übereinstimmen, die durch andere zuverlässige Referenzmethoden (z.B. Gaschromatographie plus Massenspektrometrie 'GCMS') erhalten wurden (1, 52).

2.7.6.2. Der Blank oder Probenleerwert des RIA

Der Blank oder Probenleerwert des RIA ist ein unspezifischer und unerwünschter Effekt des Assaysystems, der zu fehlerhaften Ergebnissen führt. Kein RIA erfüllt die Bedingungen der Zuverlässigkeit ohne seine gleichzeitige Bestimmung (1). Viele Ursachen sind rein chemischer Natur und können daher vermieden werden.

Zwischen der Affinität eines Antiserums und dem Blank des RIA besteht

eine Beziehung. Sie ist diesem in der Regel umgekehrt proportional. Antiseren mit geringer Affinität können entscheidende Ursache hoher Probenleerwerte sein (1, 52).

Der Blank kann entweder positiv oder negativ sein. Positive Blanks verursachen eine Abnahme der Bindung der Substanz an den Antikörper. Es ist im einzelnen nicht bekannt, welche organischen und anorganischen Stoffe zu positiven Probenleerwerten führen (1).

Substanzen, die die Trennung von freiem und antikörpergebundenem Steroid - z.B. die Adsorption an die Kohle - stören, bewirken negative Blanks. So sind u.a. hohe Konzentrationen von Lipiden und Proteinen dafür verantwortlich zu machen. Die Interferenz dieser Substanzen führt zur unvollständigen Adsorption der freien Steroide und damit zu erhöhter Radioaktivität der Lösung mit den Antikörperkomplexen im Überstand nach dem Zentrifugieren. In Tab. 3 sind die bekannten Ursachen positiver und negativer Blanks aufgeführt.

Hieraus ergibt sich die Konsequenz, in jedem RIA einen Probenleerwert mit steroidfreiem Plasma mit anzusetzen um eine Kontrolle über den Einfluß der biologischen Flüssigkeit und über die Verwendbarkeit des Assays zu haben. Bei positiven Blanks wurde der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung berechnet und vor der Korrektur für die Wiederfindung der Chromatographie von der unbekannten Probe subtrahiert, vorausgesetzt, er war größer als die Empfindlichkeit des RIA (2.7.7.3.). Beträgt der Blank mehr als 10% des maximalen Standards (80 pg für Aldosteron, 200 pg für Corticosteron und 500 pg für Cortisol), so muß der Assay verworfen werden, da nicht bekannt ist, wie weit die interferierenden Substanzen die Standardkurve verändern (1).

Ursachen positiver Blanks:

biologische Flüssigkeiten
Affinität des Antiserums
Substanzen, die
- mit den Steroiden um die Antikörperbindungsstellen konkurrieren
- die Steroidmoleküle binden, so daß diese nicht mehr mit dem Antiserum reagieren können
- das Antiserum teilweise zerstören, was zur Abnahme dessen Affinität und/oder Kapazität führt
- die Steroide zerstören.

Ursachen negativer Blanks:

Lösungsmittel
Chromatographiesystem
Glaswaren (Rückstände von Detergentien, Alkali, usw.)
Verunreinigungen des zum Abdampfen verwendeten Stickstoffs
Laborpersonal (Steroide im Speichel)
hohe Lipid- oder Proteinkonzentrationen im Plasma

Tab. 3 Ursachen der Blanks (modifiziert nach ABRAHAM) (1).

2.7.6.3. Der Einfluß der Chromatographie auf die Gleichgewichtsreaktionen des RIA

Am Beispiel der Standardkurve des Aldosteron-RIA wurde überprüft, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß die Chromatographie Einfluß auf den RIA hat. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß es während der Säulenpassage zu einer Verunreinigung der Probe durch Substanzen (z.B. Gelpartikel) kommt, die zu einer Interferenz bei der Adsorption der freien Steroide an die Aktivkohle-Dextran-Suspension führen und Ursache negativer Blanks sein können (2.7.6.2.). Dahinter steht die Frage, ob den Standards steroidfreies Säuleneluat zugesetzt werden muß, um exakt dieselben Bedingungen für Standards und Proben zu schaffen.

Zu diesem Zweck wurde nach gründlichem Spülen der Säulen mit reinem Laufmittelgemisch 2 x 8 ml steroidfreies Eluat - hier entsprechend dem Volumen der Aldosteronfraktion - gesammelt, abgedampft, in Äthanol wieder gelöst und in definierten Mengen in die Probenröhrchen einer Standardkurve gegeben und nach dem Arbeitsschema des RIA weiter verarbeitet (2.10). Parallel dazu wurde im selben RIA-Ansatz eine zweite Standardkurve ohne Säuleneluat angesetzt.

2.7.6.4. Empfindlichkeit (sensitivity)

Die Empfindlichkeit eines RIA (S_{RIA}) ist definiert als die kleinste mit der Methode meßbare Steroidmenge, die bei einem Vertrauensbereich von 95% signifikant verschieden von Null ist. Wie bereits erwähnt, ist die Grenze der mit einem Antiserum theoretisch erreichbaren Empfindlichkeit (S_{th}) durch die Affinitätskonstante (K_a) gegeben (2.7.3.3.).

Grundsätzlich ist zwischen der Empfindlichkeit der Standardkurve (S_s) und der Empfindlichkeit des RIA (S_{RIA}) zu unterscheiden (1,3):

(1) Die Empfindlichkeit der Standardkurve (S_s)

Aus $S_{th} = \frac{0,1}{K_a} \; (\frac{mol}{l})$ (2.7.3.3.) ergibt sich ferner ihre

Abhängigkeit von:

- der Masse des radioaktiv markierten Steroids und des Antiserums
- dem Assay- oder Inkubationsvolumen

Außerdem spielt die Reproduzierbarkeit der Methode eine Rolle. Sind die Blanks meßbar (größer Null), so ist die Empfindlichkeit der Standardkurve gleich der zweifachen Standardabweichung (SD) des Mittelwertes des Blanks (1). Bei nicht meßbaren, negativen Blanks errechnet sich die Empfindlichkeit aus der Streuung der Bindungsprozente der Standardkurve bei 0 pg eingesetzter Menge des endogenen Steroids (31).

$$S_s = 2 \times SD_{0 \text{ pg}}$$

(2) Empfindlichkeit des RIA (S_{RIA})
Sie ist abhängig von der Empfindlichkeit der Standardkurve (S_s), dem Blank und der Wiederfindung nach der Chromatographie.

Wesentlicher als die Empfindlichkeit der Standardkurve (S_s) ist die kleinste im Plasma bestimmbare Menge eines Steroids (S_{RIA}). Sowohl die Wiederfindung nach der Chromatographie (Wf), als auch die in den RIA eingesetzte Menge der Probe (d) beeinflussen diese Größe. Die Empfindlichkeit des RIA (S_{RIA}) errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$S_{RIA} = \frac{2 \times SD}{Wf \times d} \times 100$$

Wf und d werden in Prozent eingesetzt. Daraus ergibt sich, daß die Empfindlichkeit des RIA um so größer wird, je kleiner SD und je größer die Wiederfindung und die in den RIA eingesetzte Menge der Probe ist (1).

2.8. Qualitätsmerkmale der Methode

Richtigkeit (accuracy) und Reproduzierbarkeit (precision) stellen die beiden entscheidenden Kriterien der Qualität einer Methode dar. Ihre Kenntnis ist für die Interpretation und den Vergleich von Meßergebnissen unbedingte Voraussetzung.

2.8.1. Die Richtigkeit der Methode (accuracy)

Fehler führen während der Analyse zu einer Differenz der Meßergebnisse von der tatsächlichen Steroidkonzentration im Plasma. Die Zahl der Fehlerquellen ist der Zahl der Einzelschritte des Analysenganges - Ansatz, Extraktion, Chromatographie und RIA - direkt proportional. Werden bekannte Mengen der Steroide in steroidfreiem Plasma bzw. Gammaglobulin-Puffer oder unterschiedliche Volumina eines Plasmapools (2.1.) wie unbekannte Proben behandelt, so läßt sich eine Aussage über die Richtigkeit der Methode (accuracy) machen.

In Diagrammen wurden eingesetzte gegen wiedergefundene Menge bzw. Poolvolumina gegen die Konzentration der Steroide aufgetragen. Die Berechnung der Korrelations- und Regressionskoeffizienten diente dem

Nachweis der direkten linearen Beziehung beider Parameter. Darüber hinaus wurde die wiedergefundene Menge in Prozent der eingesetzten Menge in einer Tabelle angegeben.

2.8.2. Die Reproduzierbarkeit der Methode (precision)

Die Bestimmung einer Probe in verschiedenen Analysengängen ergibt eine Abweichung der Ergebnisse voneinander. Die Reproduzierbarkeit (precision) beschreibt diese Schwankung, ihre statistische Größe ist der Variationskoeffizient. Es ist zu erwarten, daß der Variationskoeffizient, d.h. die Streuung der Meßergebnisse um den Mittelwert um so größer ist, je mehr Einzelschritte zur Analyse notwendig sind.

Es wurde zwischen der Reproduzierbarkeit der gesamten Methode (between assay precision) - Ansatz, Extraktion, Chromatographie und RIA - und der Reproduzierbarkeit des RIA allein (within assay precision) unterschieden. Allgemein gilt, daß die between assay precision größer ist als die within assay precision (3).

Die between assay precision diente dem Vergleich der Meßergebnisse verschiedener Analysengänge. Dazu wurde eine definierte Menge der Steroide in steroidfreiem Plasma (2.1.1.) bzw. gleiche Volumina eines Plasmapools wie eine unbekannte Probe behandelt (2.10.). Die Mittelwerte, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient wurden berechnet.

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, die Methode so weit als möglich zu rationalisieren und damit für die Routine in der Endokrinologie nutzbar zu machen. Aus diesem Grund verwendeten wir für die drei Steroide - Corticosteron, Aldosteron und Cortisol - dasselbe

Arbeitsschema des RIA. Um die Reproduzierbarkeit der Assays zu vergleichen, setzten wir eine bekannte Steroidmenge in steroidfreiem Plasma zehnmal in den Assay ein. Damit sollte überprüft werden, ob dasselbe Arbeitsschema für die drei Assays vertretbar ist, zumal für den Corticosteron-RIA mangels eines spezifischen Antiserums die Kreuzreaktion des Cortisolantikörpers benützt wurde.

2.9. Auswertung der Meßergebnisse

Bei der Auswertung der Meßergebnisse fanden zwei einfache Verfahren Anwendung. Einmal wurde die unbekannte Konzentration an der graphischen Bezugskurve (Standardkurve) abgelesen. Zum anderen benützten wir eine annähernde Linearisierung der Standardkurve, indem wir die Konzentration gegen die gezählte, reziproke Radioaktivität auftrugen (pg gegen $\frac{1}{cpm}$) und mit einem einfachen Tischrechner (DIEHL combitron S) die lineare Regression und daraus wiederum die Menge (y) der in den RIA eingesetzten unbekannten Probe berechneten.

Positive und negative Blanks (c), die größer als die Empfindlichkeit der Standardkurve (S_s) waren, wurden vor der Korrektur für die Wiederfindung nach der Chromatographie (Wf) subtrahiert (4). Waren sie kleiner als die Empfindlichkeit der Standardkurve (S_s), so blieben sie unberücksichtigt.

Die Plasmakonzentration (x) in ng/ml errechnet sich mit Hilfe der Wiederfindung nach der Chromatographie (Wf), des Teilungsfaktors (d) des in den RIA eingesetzten Teils der Probe (2.10) und der Blanks (c) nach folgender Gleichung:

$$x = \frac{(y - c) \times 100 \times 100}{Wf \times d}$$

für c größer 0
und c größer S_s

Bei Wiederfindungen nach der Chromatographie unter 40% sollten die Proben wegen der zu großen Fehlermöglichkeit bei der Hochrechnung auf die Plasmakonzentration verworfen werden.

Bessere Näherungsverfahren der Standardkurve, wie logitlog-Transformation oder Spline-Funktion konnten aufgrund des Fehlens geeigneter Programme bzw. Rechner in dieser Arbeit keine Verwendung finden.

2.10. Arbeitsschema des RIA

Die nach der Chromatographie gewonnenen Probefraktionen wurden unter konstantem Stickstoffstrom im Aluminiumblock bei 40°C abgedampft und in 2 ml Äthanol absolut p.a. (4°C) wieder gelöst. Die Aufteilung geschah im allgemeinen nach folgendem Schema:

	Corticosteron	Aldosteron	Cortisol
2 x Wf in Szintillationsgefäße	200 µl (10%)	200 µl (10%)	750 µl (37,5%)
2 x in RIA-Röhrchen	750 µl (37,5%)	750 µl (37,5%)	100 µl (5%)

Anschließend wurden die Szintillationsgefäße und die RIA-Röhrchen mit der äthanolischen Lösung im Vakuumofen bei 40°C abgedampft. In die Zählgefäße der Wiederfindung wurde je 150 µl Gammaglobulin-Puffer zur Quenchkorrektur und 10 ml BRAY-Szintillator pipettiert und im ISOCAP 300 gezählt, nachdem sie ca. 6 Stunden bei völliger Dunkelheit - zur Vermeidung der Photolumineszenz - gestanden hatten (2.3.3.).

In die RIA-Röhrchen wurden der Reihe nach die Substanzen der Gruppe I (s.u.) pipettiert. Der Ansatz wurde 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad (3.3.4.) sanft rotierend mit dem modifizierten Rotary-Evapomix geschüttelt (Schüttelinkubation) und blieb danach 2 Stunden bei 0°C im Eis-Wasser-Bad zur Stabilisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe stehen (Ruheinkubation).

	100%-Wert	Standards	Proben	
Antiserum 9		500 µl	500 µl	I
5000 dpm in Gammaglobulin-Puffer	100 µl	100 µl	100 µl	
Gammaglobulin-Puffer	500 µl			
Kohle-Dextran-Suspension		100 µl	100 µl	II
Gammaglobulin-Puffer	100 µl			

Anschließend wurde die Aktivkohle-Dextran-Suspension rasch zu allen Proben pipettiert (Gruppe II, s.o.). Während dieser Zeit mußte die Kohle im Vorratsgefäß (100 ml Erlenmeyerkolben) mit einem Magnetrührer ständig gerührt werden, um eine gleichmäßige Durchmischung der Suspension zu erreichen, denn die Adsorption ist stark von der Konzentration des Adsorbens abhängig (2.7.5.). Es folgten weitere 15 Minuten bei 0^{oC} im Eis-Wasser-Bad. Das Zentrifugieren im Ausschwingrotor der Kühlzentrifuge (1500 g x 20 min) beendete die Kohle-Adsorption. Mit dieser Technik lassen sich die beiden Phasen sehr gut voneinander trennen und die Kohle setzt sich dabei so fest am Boden des RIA-Röhrchens ab, daß der Überstand mit den Antiserumkomplexen problemlos in die Zählgefäße dekantiert werden kann. Die mit einem markierten Schraubdeckel verschlossenen Zählgefäße wurden kurz von Hand geschüttelt. Bevor sie im Szintillationsspektrometer gezählt wurden, blieben sie ca. 6 Stunden bei Dunkelheit stehen (2.3.3.).

3. ERGEBNISSE

3.1. Extraktion

Nach zweifacher Extraktion mit je 5 ml Dichlormethan waren mindestens 87,5%, im Mittel 95,8% des radioaktiven Steroids aus dem Plasma entfernt. Eine dritte Extraktion brachte keine weiteren Vorteile. Dadurch konnte die Wiederfindung im Mittel nur um weniger als 1% gesteigert werden.

Das Waschen der Extrakte mit Natronlauge (NaOH) zur Entfernung der Lipide, führte zur Bildung von Emulsionen und damit zur schlechteren Trennung der wäßrigen und Lösungsmittelphase, was zu einer geringeren Extraktion der Steroide aus dem Plasma führte. Außerdem brachte es keine Verbesserung der Blanks im RIA. Daher wurde auf diesen Schritt verzichtet.

3.2. Chromatographie

3.2.1. Elutionsmuster der 60 cm Säule

Die Abb. 11 zeigt das typische Elutionsmuster von neun tritiierten Steroiden nach Chromatographie auf einer 60 cm Sephadex LH-20 Säule mit Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v) als Eluens, bei einer konstanten Flußrate von 40 ml/h. Eine vollständige Trennung von 11-Deoxycortisol, Aldosteron, Cortison und Cortisol ist möglich. Zwischen Testosteron und Corticosteron zeigt sich eine geringe Überlappung der Peaks von zwei bis drei Fraktionen, entsprechend maximal 30% des jeweiligen Peaks. 11-Deoxycorticosteron, Progesteron und 17-

Hydroxyprogesteron lassen sich mit dieser Methode zwar von den anderen Steroiden, jedoch nicht voneinander trennen.

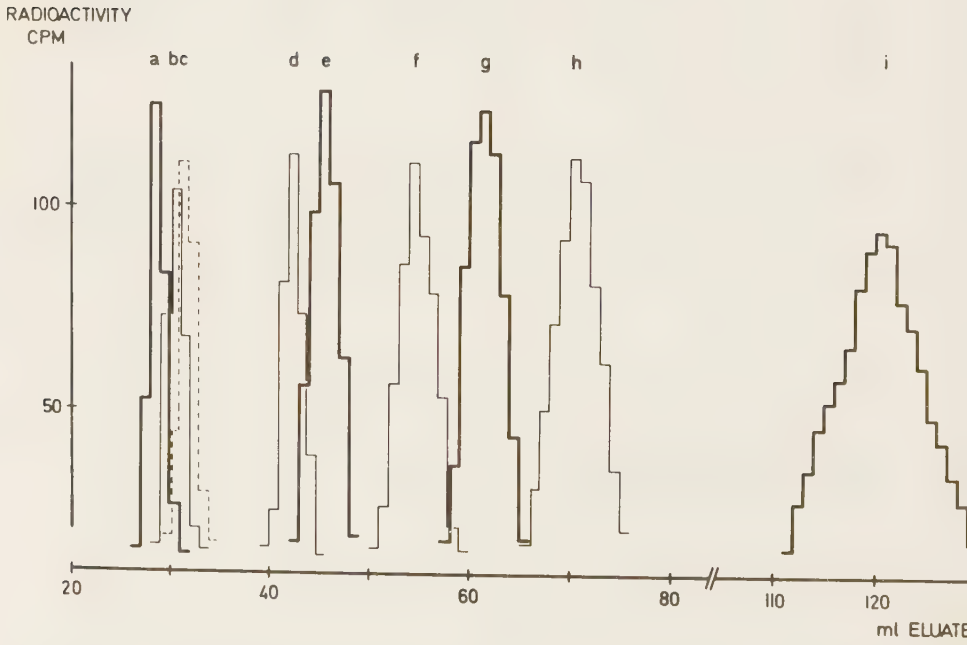


Abb. 11 Elutionsmuster radioaktiver Steroide auf einer 60 cm Sephadex LH-20 Säule mit Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v).
a) Progesteron, b) 11-Deoxycorticosteron, c) 17-Hydroxyprogesteron,
d) Testosteron, e) Corticosteron, f) 11-Deoxycortisol,
g) Aldosteron, h) Cortison, i) Cortisol.

3.2.2. Trennungsmechanismen der Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 und Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v)

Die Beziehung von Molekurlargewicht (MW) und Elutionsvolumen (V_e) sind in Abb. 12 dargestellt. Es besteht keine Relation zwischen beiden Größen. Dies bestätigt die von ENEROTH und NYSTRÖM gefundene Tatsache, daß bei Verwendung des polaren Sephadex LH-20 und nicht polaren Laufmitteln die Substanzen entsprechend ihrer Polarität aufgetrennt werden (25). Die geringe Erhöhung der Polarität des Laufmittels zur Vermeidung der Adsorption, die sich in einer Verbreiterung der Basen der Peaks zeigt, hatte keinen Einfluß auf den Trennungsmechanismus.

Die NNR-Steroide unterscheiden sich durch die Zahl und die sterische Anordnung der Hydroxyl- und Keto-Gruppen am Pregnan-Grundgerüst (C_{21}). Die Anzahl dieser Gruppen ist für die geringen Unterschiede der Molekulargewichte verantwortlich. Daraus ergab sich die Frage, ob das Molekulargewicht nicht doch, wenn auch von untergeordneter Bedeutung, für die Mechanismen der Chromatographie verantwortlich war. Dies konnte am Beispiel von 17-Hydroxyprogesteron und Testosteron (C_{19}!) sowie Aldosteron und Cortisol verneint werden (Abb. 12).

Das von ENEROTH und NYSTRÖM beschriebene Phänomen des "Keton-Ausschlusses" (s.o. S. 25) wurde bestätigt (25): u.a. am Beispiel von Cortison und Cortisol. Beide Substanzen, deren Molekulargewicht (MW) praktisch identisch ist (MS 360 bzw. 362), unterscheiden sich nur durch die Keto- bzw. Hydroxylgruppe an C_{11} des Pregnangrundgerüstes. Hingegen ist das Elutionsvolumen (V_e) von Cortisol mit 120 ml nahezu doppelt so groß wie das von Cortison mit 71 ml.

Abb. 12 Die Beziehung zwischen dem Molekulargewicht (MW) und dem Elutionsvolumen (V_e) der einzelnen Steroide.

3.2.3. Reproduzierbarkeit der Elution

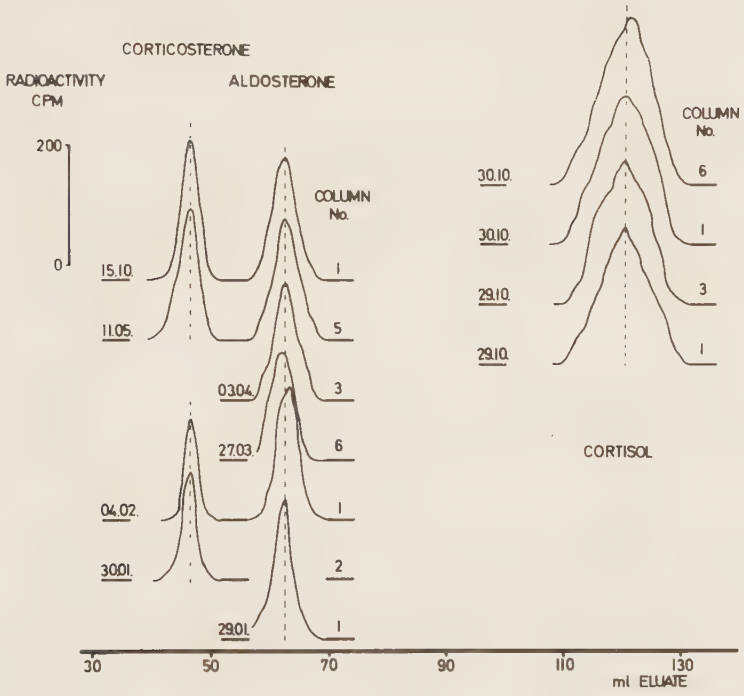


Abb. 13 Reproduzierbarkeit der Elutionsmuster bei mechanisierter Chromatographie.

Unter standardisierten Bedingungen, d.h. bei konstanter Flußrate, konstanter Temperatur, gleichzeitigem und gleichartigem Packen der Säulen usw., ließ sich über einen Zeitraum von 10 Monaten (Abb. 13) sowohl zwischen den Säulen 1 bis 6, als auch bei einzelnen Säulen kein Unterschied der Elutionsmuster feststellen. Die Elutionsmuster waren sehr gut reproduzierbar.

Bei durchschnittlich 3 - 4 Elutionen pro Woche ließen sich die einmal gepackten Säulen mindestens 10 Monate lang verwenden, ohne daß eine Zunahme der Blanks bzw. Abnahme der Nullwertbindung im RIA zu erkennen war, die eine Erneuerung bzw. Reinigung des Gels notwendig gemacht hätte.

3.2.4. Vergleich der Elutionsmuster von Säule 1 und 6 bei der mechanisierten Chromatographie

Um die Kapazität der Trennungsmethode zu vergrößern, wurde auf 6 parallellaufenden Säulen gleichzeitig chromatographiert. In Abb. 14 sind die Elutionsmuster von tritiiertem Progesteron, 11-Deoxycortisol und Cortisol unter Routinebedingungen dargestellt. Diese drei Steroide wurden entsprechend ihrer Elutionsvolumina (V_e) ausgewählt, so daß jeweils der Beginn, die Mitte und das Ende der Chromatographie repräsentiert waren. Es ist zu erkennen, daß die Differenz beim ersten Steroid nicht mehr als eine Fraktion betrug. Das entspricht der Zeit für das Auftragen der Extrakte auf die Säulen 1 bis 6. Nur für Cortisol fand sich ein Unterschied von zwei Fraktionen, bedingt durch das große Elutionsvolumen. Diese Differenz

war aber in der Praxis ohne Bedeutung, da es beim Cortisol zu keiner Überlappung mit anderen Steroiden kam.

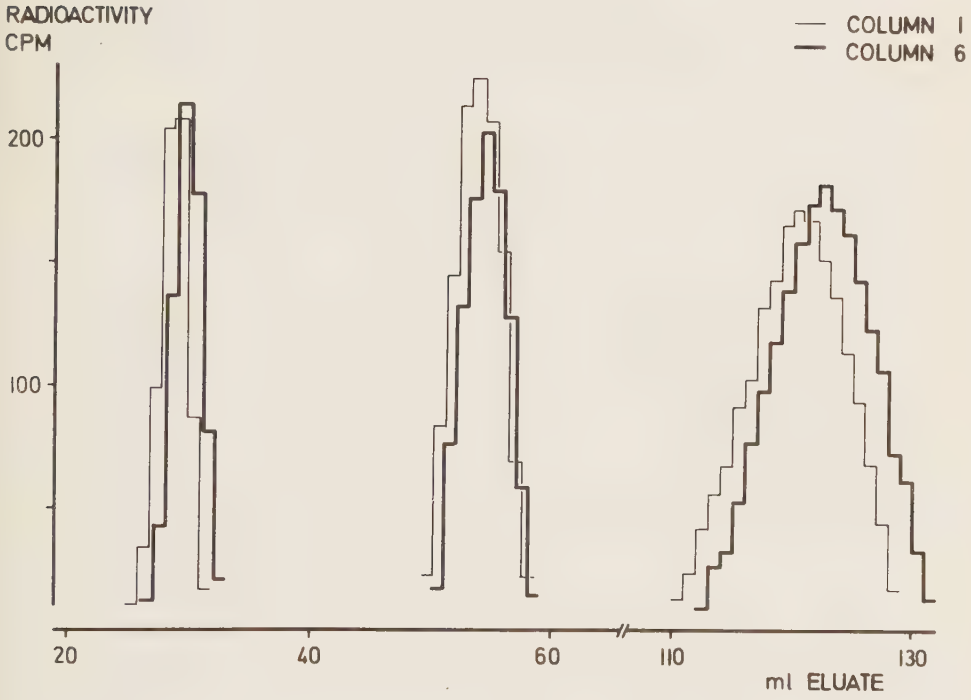


Abb. 14 Elutionsmuster von Säule 1 und 6 während simultaner, mechanisierter Chromatographie von Progesteron, 11-Deoxycortisol und Cortisol auf einer 60 cm Sephadex LH-20 Säule mit Dichlormethan/ Methanol = 98/2 (v/v).

Um eine gute Trennung der Steroide trotz der erwähnten Differenz der Chromatographiemuster zu garantieren, sollten die Peaks bei der mechanisierten Chromatographie etwas beschnitten werden.

3.2.5. Wiederfindung und Peakbreite der tritiierten Steroide bei der Festlegung der Elutionsmuster der 60 cm Sephadex LH-20 Säule mit Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v)

Steroide	Wf (%)	Peakbreite (Nr)	(ml)
Progesteron	93,0	27 - 30	4
11-Deoxycorticosteron	78,5	29 - 32	4
17-Hydroxyprogesteron	80,0	30 - 33	4
Testosteron	90,0	40 - 44	5
Corticosteron	81,0	43 - 48	6
11-Deoxycortisol	78,0	50 - 57	8
Aldosteron	78,0	57 - 66	9
Cortison	79,0	67 - 75	12
Cortisol	75,0	112 - 129	18

Tab. 4 Wiederfindung (Wf) und Peakbreiten bei der Festlegung der Elutionsmuster

Bei der Festlegung der Elutionsmuster der 60 cm Sephadex LH-20 Säule mit Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v) ergaben sich für die tritiierten Steroide folgende Wiederfindungen und Peakbreiten (Tab. 4).

Die Abnahme der Wiederfindung (Wf) mit steigender Elutionsdauer ging der Zunahme der Peakbreiten parallel. Dies ist durch die Anzahl der "theoretischen Böden" - Adsorptions-Desorptions-Zyklen - zu erklären (2.6.3.3.). Die geringe Radioaktivität der Randfraktionen der Steroide mit großen Elutionsvolumina (V_e) ist Ursache zunehmender Zählfehler, besonders, wenn die Aktivität sich nur wenig vom Background des Zählgerätes unterscheidet.

3.2.6. Wiederfindung, Peakbreiten und Variationskoeffizienten der Wiederfindungen zwischen den Säulen 1 - 6 während mechanisierter Chromatographie

Die technisch bedingte geringe Verschiebung der Elutionsmuster der Säulen während der mechanisierten Chromatographie führte zu einer Überlappung von Cortison und Aldosteron - maximal eine Fraktion (Abb. 11 und 14). Deshalb wurden unter diesen Bedingungen die Peaks der beiden Substanzen am Anfang und Ende um je eine Fraktion beschnitten, um eine wechselseitige Verunreinigung zu vermeiden. Die dadurch bedingte geringe Abnahme der Wiederfindung wurde zugunsten der Reinheit in Kauf genommen, zumal die Reproduzierbarkeit der Chromatographie sehr gut war (3.2.3.).

Beweisend für die gute Reproduzierbarkeit der Chromatographie sind die geringen Variationskoeffizienten der Wiederfindung der Säulen 1 - 6. Dazu wurden die Variationskoeffizienten der Wiederfindung je Säule aus 11 Chromatographien berechnet. Aus den Ergebnissen ergab sich der in Tab. 5 angegebene Mittelwert der Variationskoeffizienten der sechs Säulen.

Steroide	gesammelte Fraktionen (Nr)	gesammelte Volumina (ml)	Wiederfindung (%)	n	Variationskoeffizient d. Wf von Säule 1 - 6
Corticosteron	44 - 48	5	66,2 ± 6,5	11 x 6	8,1
Aldosteron	58 - 65	8	63,9 ± 4,9	11 x 6	6,7
Cortisol	114 - 125	12	49,4 ± 5,9	11 x 6	10,3

Tab. 5 Peakbreiten, Wiederfindungen sowie mittlere Variationskoeffizienten der Wiederfindung zwischen den Säulen 1 - 6 von Corticosteron, Aldosteron und Cortisol während der mechanisierten Chromatographie auf 6 parallel eluierten Säulen.

Beim Cortisol wurden die Randfraktionen deshalb verworfen, weil das im Vergleich zu Corticosteron und Aldosteron große Gesamtvolumen der Fraktion einen Anstieg des Blanks im RIA erwarten ließ.

3.2.7. Berechnung von Chromatographieparametern

In Tab. 6 sind Elutionsvolumina (V_e), relative Elutionsvolumina (V_e/V_t), Verteilungskoeffizienten (K) und Anzahl der "theoretischen Böden" (N) der 60 cm Sephadex LH-20 Säule bei Verwendung von Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v) wiedergegeben. Sie dienen dem Vergleich mit anderen Chromatographiesystemen.

Entscheidendes Kriterium der Brauchbarkeit eines Chromatgraphiesystems ist dessen Auflösungsvermögen. Das Maß der quantitativen Trennung zweier Substanzen ist der Auflösungskoeffizient (R_s) der Säule (2.6.3.3.). Ist R_s = 1,0, so befinden sich 2% der benachbart eluierten Substanz in der Probe. Für R_s = 1,5 beträgt die Reinheit der Substanz nach der Säulenpassage 99,9%. Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Chromatographiesystem ließ sich eine Reinheit der Aldosteronfraktion gegenüber 11-Deoxycortisol von 95% und gegenüber Cortison von 98% erzielen (Tab.7).

Steroide	V_e (ml)	V_e/V_t	K	N
Progesteron	28	0,49	0,38	784
11-Deoxycorticosteron	30	0,53	0,45	816
17-Hydroxyprogesteron	31	0,54	0,49	855
Testosteron	42	0,74	0,88	900
Corticosteron	45	0,79	0,98	910
11-Deoxycortisol	54	0,94	1,3	920
Aldosteron	61	1,07	1,55	930
Cortison	72	1,26	1,93	1012
Cortisol	120	2,1	3,62	1498

Tab. 6 Elutionsvolumina (V_e), relative Elutionsvolumina (V_e/V_t), Verteilungskoeffizienten (K) und Zahl der "theoretischen Böden" (N) der 60 cm Sephadex LH-20 Säule mit Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v).

Steroide	R_s	Reinheit
11-Deoxycortisol/Aldosteron	0,93	95%
Aldosteron/Cortison	1,07	98%

Tab. 7 Auflösungskoeffizient der 60 cm Sephadex LH-20 Säule mit Dichlormethan/Methanol = 98/2 (v/v) und Reinheit der Aldosteron-fraktion.

3.3. Radioimmunoassay

3.3.1. Standardkurven

Die Standardkurven sind Ausdruck der kompetitiven Hemmung von endogenem und tritiiertem Steroid bei der Bindung an das Antiserum, die dem Massenwirkungsgesetz gehorcht. Diese Dosis-Wirkungs-Beziehung ist eine Exponentialfunktion (2.7.2.). In den Abb. 15, 16 und 17 sind die typischen Standardkurven von Corticosteron, Aldosteron und Cortisol und die Standardabweichung der Mittelwerte aus n = 18 Messungen abgebildet.

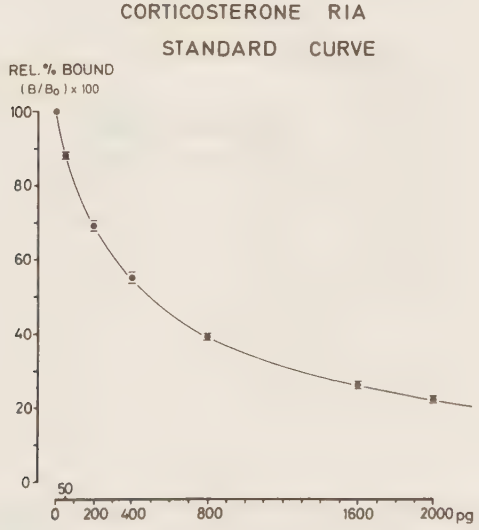


Abb. 15 Corticosteron-Standardkurve

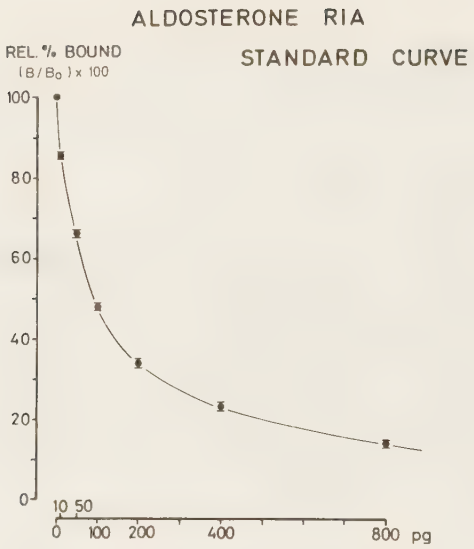


Abb. 16 Aldosteron-Standardkurve

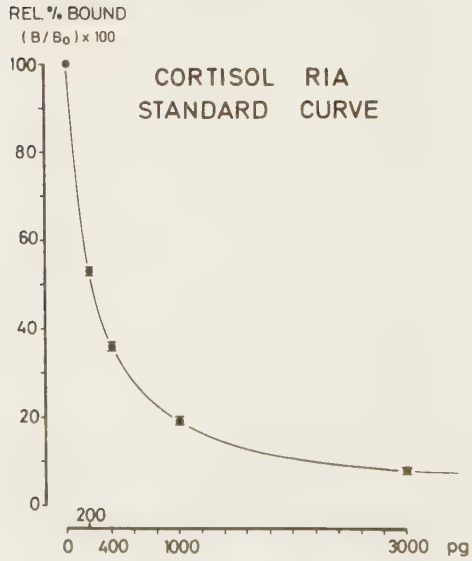


Abb. 17 Cortisol-Standardkurve

Steroide	Standard (pg)	$B/B_0 x100$	± SD	mittlere Streuung
Cortico-steron	0	100,00	± 6,26	± 2,52
	50	88,88	± 5,09	± 1,83
	200	69,61	± 6,07	± 1,81
	400	55,15	± 6,59	± 1,09
	800	39,92	± 5,14	± 0,87
	1600	26,28	± 4,19	± 0,95
	2000	22,26	± 3,53	± 0,57
Aldosteron	0	100,00	± 6,19	± 1,68
	50	66,24	± 4,05	± 0,76
	100	48,43	± 4,09	± 1,12
	200	34,13	± 5,21	± 0,59
	400	23,48	± 4,64	± 0,66
	800	14,55	± 3,72	± 0,42
Cortisol	0	100,00	± 6,28	± 1,14
	200	53,20	± 5,35	± 1,10
	400	36,27	± 4,56	± 0,83
	1000	18,90	± 2,66	± 0,93
	3000	8,15	± 1,35	± 0,23
	5000	5,90	± 1,10	± 0,22

Tab. 8 Bindungsprozent ($B/B_0 x100$), deren Standardabweichung (SD) und mittlere Streuung der Doppelbestimmungen in % aus 18 Standardkurven von Corticosteron, Aldosteron und Cortisol.

Die Tracer-Aktivität betrug etwa 5000 dpm, was je nach spezifischer Aktivität der tritiierten Steroide einer Substanzmenge von 8 - 12 pg entsprach. Damit lag die Menge des Tracers im Bereich der Empfindlichkeit der Standardkurven (3.3.5.) und blieb daher bei der Berechnung der unbekannten Proben unberücksichtigt (2, 35).

In Tab. 8 sind die mittleren Bindungsprozent ($B/B_0 \times 100$), deren Standardabweichung (SD) und die Streuung der Einzelwerte (Doppelbestimmungen) in Prozent aus 18 verschiedenen Standardkurven angegeben.

3.3.2. Der Einfluß der Chromatographie auf die Gleichgewichtsreaktionen des RIA

Der Vergleich der beiden Aldosteron-Standardkurven mit und ohne steroidfreies Säuleneluat ergab eine deutliche Abnahme der Bindungsprozent der Kurve, der steroidfreies Eluat zugesetzt worden war. Verunreinigungen durch das Säuleneluat (z.B. Gelpartikel) interferieren bei der Bindung der Steroide an das Antiserum und führen dadurch zur Abnahme der Bindungsprozent. Würde den Standardkurven kein steroidfreies Eluat zugesetzt, käme es zu einem Anstieg der Blanks im RIA (2.7.6.2.).

Beide Standardkurven verliefen parallel. Für beide war damit

$\frac{d(B/F)}{d(S)}$ identisch, d.h. beide Kurven hatten dieselbe Empfindlichkeit

(2.7.2.).

Daraus ergab sich die Konsequenz, der Standardkurve steroidfreies Säuleneluat zuzusetzen, um eine Ursache positiver Blanks im RIA auszuschließen und exakt gleiche Bedingungen für Proben und Standardkurven zu schaffen.

3.3.3. Spezifität der Antiseren

Steroide	Aldosteron-AS (C_{21}-Konjugat, VECSEI)	Cortisol-AS (C_{21}-Konjugat, BINDLINGMAIER
Progesteron	1,16	10,6
11-Deoxycorticosteron	1,04	32,1
17-Hydroxyprogesteron	0,17	19,5
Corticosteron	7,60	10,9
11-Deoxycortisol	0,17	46,3
Aldosteron	100,00	3,2
Cortison	0,27	100,0
Cortisol	0,48	100,0
Androstendion	0,12	2,4
Testosteron	0,30	3,1
Östradiol	0,01	0,1
Titer	1 : 10000	1 : 10000

Tab. 9 Kreuzreaktionen des Aldosteron- und Cortisol-Antiserums in Prozent der Aldosteron- bzw. Cortisolbindung.

Die Spezifität eines Antiserums ist durch seine Kreuzreaktionen mit anderen Steroiden gegeben (2.7.3.4.). Die Kreuzreaktionen des Aldosteron- und Cortisol-Antiserums mit wesentlichen Substanzen der Steroidbiosynthese, einschließlich der Androgene und Östrogene, sind in Tab. 9 wiedergegeben.

Auffällig war die quantitativ bedeutende Reaktion des Aldosteron-Antiserums mit Corticosteron, bei ansonsten unbedeutender Bindung der übrigen untersuchten Steroide. Die Kreuzreaktionen des Cortisol-antiserums lagen beträchtlich höher als die des Aldosteron-Antikörpers. Beide Antiseren zeigten jedoch sehr geringe Reaktionen mit Androstendion, Testosteron und Östradiol.

3.3.4. Die Inkubationszeit beim Aldosteron-RIA

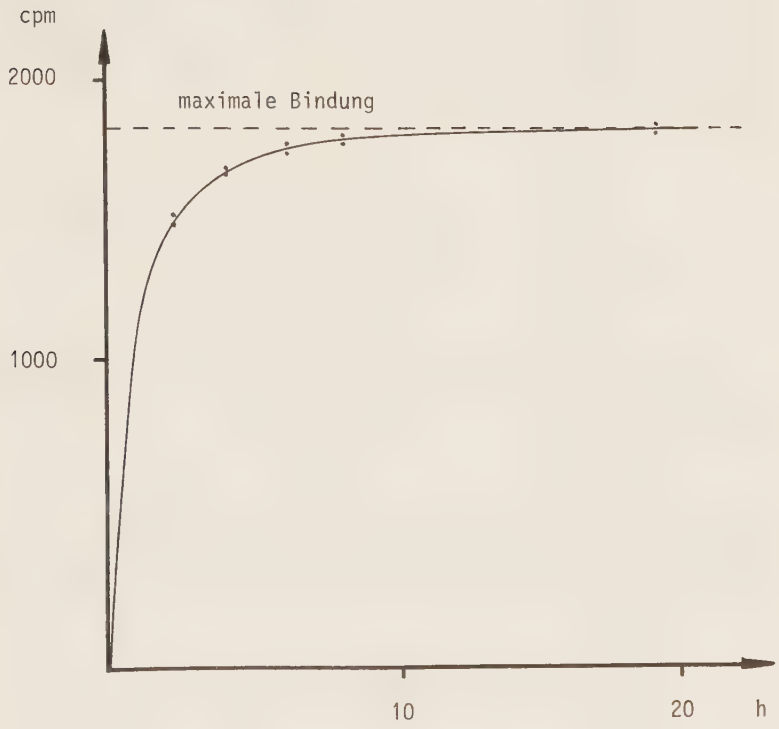


Abb. 18 Die Bindung von tritiiertem Aldosteron an das Antiserum in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Abb. 18 zeigt die Exponentialfunktion der Bindung des tritiierten Steroids an das Antiserum. Die Bindung nahm in den ersten 2 Stunden stark zu und näherte sich danach asymptotisch ihrem Maximum, das nach etwa 18 Stunden erreicht war. Setzt man die Bindung nach 18 Stunden gleich 100%, so ergibt sich nach 2 Stunden ein Wert von ca. 80% der maximalen Bindung. Dies erschien für die Routine als praktikabel und genau genug. Die Inkubationszeit wurde für die drei Assays auf 2 Stunden festgesetzt.

3.3.5. Die Empfindlichkeit (sensitivity) und die Blanks der Assays

Die Empfindlichkeit ist definiert als die kleinste meßbare Menge, die bei einem Vertrauensbereich von 95% signifikant verschieden von Null ist.

Die Empfindlichkeit der Standardkurve (S_s) errechnete sich aus der Standardabweichung der Nullwertbildung der Standardkurve (SD_{0pg}) (31), denn die Blanks der Assays lagen im Bereich der Empfindlichkeit der Kurven.

$$S_s = 2 \times SD_{0pg}$$

Die Ergebnisse waren 10 pg für Corticosteron, 4,7 pg für Aldosteron und 8,8 pg für Cortisol (Tab. 10).

Steroide	S_s (pg)	Wf (%)	d	S_{RIA} (ng/ml)	1,0 ml Wasser- und Plasmablanks (m ± SD) (pg)
Corticosteron	10,0	66,2	0,375	0,128	11,4 ± 13,8
Aldosteron	4,7	63,9	0,375	0,019	0,7 ± 0,7
Cortisol	8,8	49,4	0,050	0,312	7,5 ± 11,1

Tab. 10 Empfindlichkeit der Standardkurven (S_s), Wiederfindung nach der Chromatographie (Wf), in den RIA eingesetzter Teil der Probe (d), Empfindlichkeit des RIA (S_{RIA}) und Wasserblanks, sowie Blanks mit steroidfreiem Plasma.

Wichtiger jedoch war die Empfindlichkeit der gesamten Methode (S_{RIA}). Sie gibt die kleinste mit den hier beschriebenen Analysen meßbare Steroidmenge an. Sie ist von der Empfindlichkeit der Standardkurve (S_s), der Wiederfindung nach der Chromatographie (Wf) und dem Teilungsfaktor (d) der in den RIA eingesetzten Menge der Probe abhängig.

$$S_{RIA} = \frac{2 \times SD_{0pg}}{Wf \times d} \times 100$$

S_{RIA} betrug 0,128 ng/ml für Corticosteron, 0,019 ng/ml für Aldosteron und 0,312 ng/ml für Cortisol.

Zur Bestimmung der Blanks wurden Proben mit destilliertem Wasser und steroidfreiem Plasma verwendet. Zwischen beiden war kein Unterschied zu erkennen, so daß sie alternativ verwendet werden können. Hieraus folgt, daß nicht das Plasma, sondern in erster Linie die Chromatographie für die Blanks des RIA verantwortlich ist. Die Ergebnisse beider Techniken sind in Tab. 10 gemeinsam aufgetragen.

3.4. Qualitätsmerkmale der Methode

3.4.1. Die Richtigkeit der Methode (accuracy)

Anhand der Richtigkeit (accuracy) wurde die Übereinstimmung der gemessenen Steroidspiegel mit den tatsächlichen Plasmakonzentrationen der Proben geprüft (2.8.1.).

In Tab. 11 sind die eingesetzten Mengen der Steroide - in steroidfreiem Plasma oder Gammaglobulin-Puffer - gegen die wiedergefundenen Konzentrationen in Prozent der eingesetzten Menge und deren Variationskoeffizienten angegeben. Je nach eingesetzter Menge, d.h. entsprechend dem Meßbereich der Standardkurve betrugen die Werte für Corticosteron 93 - 97%, für Aldosteron 85 - 105% und für Cortisol 100 - 105%.

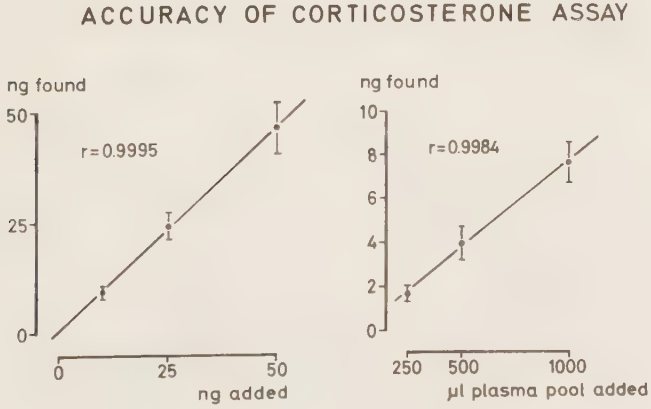


Abb. 19 Richtigkeit des Corticosteron-RIA

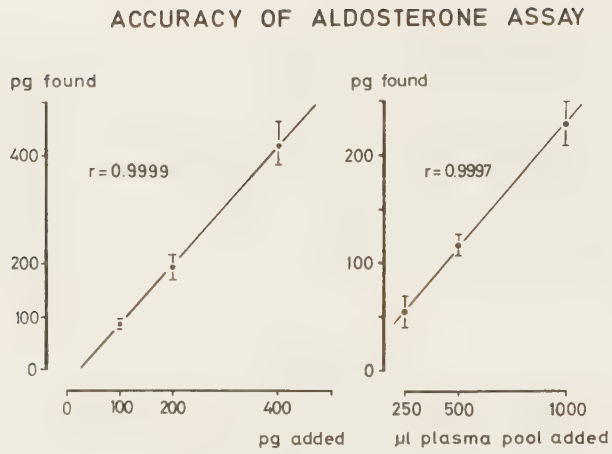


Abb. 20 Richtigkeit des Aldosteron-RIA

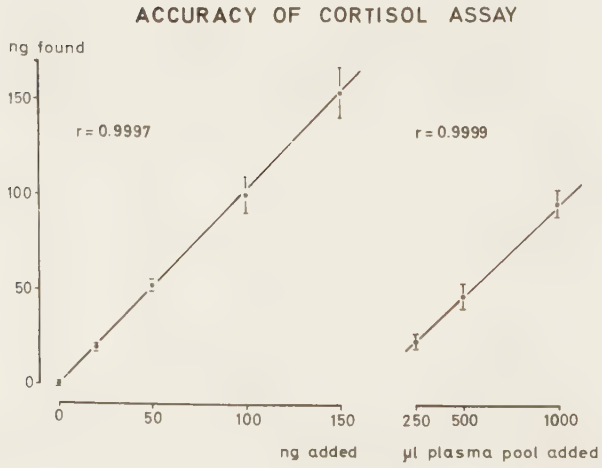


Abb. 21 Richtigkeit des Cortisol-RIA

Corticosteron

eingesetzt (ng)	wiedergefunden (% ± SD)	Variationskoeffizient (%)	n
10	93,8 ± 14,9	15,9	6
25	97,3 ± 12,0	12,4	6
50	92,8 ± 11,9	12,8	6

Aldosteron

eingesetzt (pg)	wiedergefunden (% ± SD)	Variationskoeffizient (%)	n
100	85,2 ± 9,1	10,6	6
200	95,0 ± 11,6	12,1	8
400	104,5 ± 11,5	11,0	6

Cortisol

eingesetzt (ng)	wiedergefunden (% ± SD)	Variationskoeffizient (5)	n
50	105,0 ± 6,6	6,3	6
100	99,7 ± 9,6	9,6	8
150	102,3 ± 8,6	8,6	6

Tab. 11 Richtigkeit. Wiedergefundene Menge in Prozent der eingesetzten Menge und deren Variationskoeffizienten.

Die Abb. 19, 20 und 21 zeigen auf der linken Seite jeweils die eingesetzten gegen die wiedergefundenen Mengen und auf der rechten Seite steigende Plasmapoolvolumina gegen gemessene Steroidkonzentrationen. Die Korrelationskoeffizienten waren in allen Fällen praktisch gleich +1. Dies bedeutet, daß eine lineare Beziehung zwischen den beiden Wertepaaren vorliegt. Für die Diagramme der linken Seite, d.h. eingesetzte gegen wiedergefundene Menge, wurden darüber hinaus die Regressionskoeffizienten berechnet. Sie waren für die drei Steroide ebenfalls praktisch gleich +1. Dies besagt, daß bei Änderung der eingesetzten Menge um eine Einheit die wiedergefundene Menge um den gleichen Betrag zunimmt. Im einzelnen betrugen die Regressionskoeffizienten 0,92 für Corticosteron, 1,11 für Aldosteron und 1,02 für Cortisol. Bei der zweiten Technik, der Analyse unterschiedlicher Volumina eines Plasmapools, ist der Regressionskoeffizient nicht aussagekräftig, da hier verschiedene Dimensionen miteinander verglichen wurden.

Die Ergebnisse für steroidfreies Plasma und Gammaglobulin-Puffer wurden gemeinsam angegeben, da sich keine Differenzen zwischen beiden Methoden fanden.

3.4.2. Die Reproduzierbarkeit der Methode (between assay precision)

Die Reproduzierbarkeit der Methode (between assay precision) ist das wichtigste Kriterium für den Vergleich und die Interpretation der Ergebnisse. Sie wurde als Variationskoeffizient der Einzelwerte einer Probe aus mehreren Assays angegeben (2.7.5.5.).

Die Ergebnisse wurden anhand der Richtigkeit (accuracy) gewonnen und sind in Tab. 11 aufgetragen (3.3.6.). Die Variationskoeffizienten

lagen für Aldosteron im Bereich von 10 - 12%, für Cortisol im Bereich von 6 - 10% und für Corticosteron im Bereich von 12 - 16%, also nahezu doppelt so hoch wie für Cortisol. Im Corticosteron- und Cortisol-RIA fand dasselbe Antiserum Verwendung. Daraus ist zu erkennen, daß eine bessere Reproduzierbarkeit zu erwarten ist, wenn ein spezifischeres Antiserum zur Verfügung steht.

Darüber hinaus wurde anhand der Reproduzierbarkeit des RIA (within assay precision) überprüft, ob es zulässig war, für die drei Steroide dasselbe Arbeitsschema zu verwenden (2.7.5.5.).

Steroide	eingesetzte Menge (pg)	Variationskoeffizient (%)	n
Corticosteron	800	2,5	10
Aldosteron	200	2,8	10
Cortisol	1000	3,4	10

Tab. 12 Reproduzierbarkeit des RIA (within assay precision)

Die Proben wurden unter exakt gleichen Bedingungen in einem Ansatz aufgearbeitet. Die Variationskoeffizienten für Corticosteron, Aldosteron und Cortisol lagen im Bereich von 2,5 - 3,4%, waren also praktisch identisch. Es ist damit möglich, die drei Assays nach demselben Schema zu verarbeiten.

3.5. Plasmaspiegel von Corticosteron, Aldosteron und Cortisol nach ACTH- und Dexamethason-Test

Diese Tests zeigen die Anwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Analysentechnik in der Klinik.

Eine Stunde nach Injektion von 0,25 mg ACTH (Synacthen^{R}-CIBA) zeigte sich eine unterschiedlich starke Zunahme der Konzentration der drei Steroide im Plasma (Tab. 13). Der Plasmaspiegel von Corticosteron stieg um den Faktor 35, der von Aldosteron um den Faktor 4 und der von Cortisol um den Faktor 10.

Beim Suppressionstest mit 1,0 mg Dexamethason (Fortecortin^{R}-MERCK) fand sich 10 Stunden nach oraler Verabreichung der Substanz eine Abnahme von Corticosteron um den Faktor 2,8 und von Cortisol um den Faktor 7. Die Aldosteronkonzentration hingegen stieg um den Faktor 3 (Tab. 14).

Die Unterschiede der Kontrollwerte beider Teste beruhten auf den verschiedenen Abnahmezeiten und waren Ausdruck der circadianen Schwankungen der Steroide.

ACTH - Test

Steroide	Kontrollwert (14.25 Uhr) (ng/ml)	1h nach ACTH (15.25 Uhr) (ng/ml)
Corticosteron	1,61 ± 0,15	54,80 ± 5,12
Aldosteron	0,23 ± 0,03	0,97 ± 0,07
Cortisol	37,80 ± 3,90	374,70 ± 34,90

Tab. 13 Plasmaspiegel vor und 1 Stunde nach ACTH (Synacthen^{R} - CIBA)

Dexamethason - Test

Steroide	Kontrollwert (8.45 Uhr) (ng/ml)	nach Dexameth. (8.45 Uhr) (ng/ml)
Corticosteron	1,28 ± 0,17	0,49 ± 0,09
Aldosteron	0,18 ± 0,02	0,55 ± 0,02
Cortisol	75,10 ± 6,50	10,00 ± 1,60

Tab. 14 Plasmaspiegel vor und 10 Stunden nach Dexamethason (Fortecortin^{R}- MERCK)

4. DISKUSSION

4.1. Ansatz und Extraktion

250 - 2000 µl menschliches Plasma waren notwendig, um Corticosteron, Aldosteron und Cortisol in einer Probe zu messen. Von diesem Volumen wurde nur abgewichen, wenn unter bestimmten Bedingungen mit sehr niedrigen bzw. sehr hohen Steroidkonzentrationen zu rechnen war, denn der Meßfehler ist im Bereich der Empfindlichkeit der Standardkurve (S_s) und für hohe Konzentrationen (flacher Bereich der Standardkurve) größer.

Tritiierte Steroide dienten als Tracer der Wiederfindung der Chromatographie. Obwohl ihre Stabilität in organischen Lösungen besser ist, wurden sie in Gammaglobulin-Puffer (wäßrige Phase) dem Plasma zugesetzt, um optimale Bedingungen für das Äquilibrieren mit den endogenen Plasmasteroiden zu schaffen, d.h. eine gleichmäßige Proteinbindung aller Steroide zu erreichen. Um systematische Fehler zu vermeiden, muß die Zeit zur Einstellung des Gleichgewichtes der Proteinbindung der Steroide ausreichend lang sein - mindestens 4 Stunden (1,2).

Die Extraktion diente der vollständigen Entfernung der Steroide aus dem Plasma, einschließlich der proteingebundenen. Sie ist Voraussetzung für die Chromatographie. Dazu wurde Dichlormethan verwendet, das als gutes Lösungsmittel für Steroide bekannt ist und Bestandteil des Laufmittelgemisches war. Das zweimalige Ausschütteln mit einem Volumenverhältnis von Plasma/Dichlormethan = 1/10 garantiert die vollständige Extraktion des freien wie auch des proteingebundenen Steroids (22). Im Mittel befanden sich danach 95,8% des radioaktiven Steroids im Extrakt. Eine dritte Extraktion erhöhte die Wiederfindung in der Regel um weniger als 1%, so daß darauf verzichtet wurde.

Dieses Verfahren war problemlos durchzuführen. So konnten innerhalb von 45 Minuten bequem 12 Proben von einer Person extrahiert werden. Das entsprach der maximalen Chromatographiekapazität eines Arbeitstages. Beim Ausschütteln mancher Plasmen bildeten sich an der Grenzfläche zwischen wäßriger und organischer Phase Emulsionen,die durch Plasmalipide verursacht worden sein dürften. Nach kurzem Zentrifugieren (2500 rpm x 5 min bei 0^{oC}) stellten sich die Grenzflächen wieder gut ein, so daß die Lösungsmittelphase mit der modifizierten Pasteurpipette (Abb. 3) ohne Schwierigkeiten quantitativ abgesaugt werden konnte.

Der Versuch, die Lipide mit Natronlauge (NaOH) aus dem Extrakt zu entfernen, verstärkte die Bildung von Emulsionen, die trotz Zentrifugieren die Trennung der beiden Phasen erheblich erschwerten, so daß die quantitative Überführung der Extrakte nicht gewährleistet war. Auf dieses Verfahren wurde daher verzichtet, zumal sich dadurch keine Abnahme der Blanks im RIA erreichen ließ.

4.2. Chromatographie

Die NNR-Steroide weisen lediglich geringe strukturelle Unterschiede auf und haben deshalb große Ähnlichkeit in ihren physiko-chemischen Eigenschaften (1.2.). Da die Bindung dieser Steroide an die Antiseren jedoch von den physiko-chemischen Eigenschaften abhängt, fanden sich zum Teil beträchtliche Kreuzreaktionen mit den verfügbaren Antiseren. Diese Tatsache macht die chromatographische Trennung der NNR-Steroide vor dem RIA notwendig. Dafür finden unterschiedliche Verfahren Anwendung, wie Papier- (10, 36, 42, 74), Dünnschicht- (15, 37, 67, 81) oder Säulenchromatographie mit Celit (66), Sephadex LH-20 (18, 32, 33, 49, 68, 69) sowie in letzter Zeit auch Lipidex (28). In der Tab. 15 sind die Vor- und Nachteile der, zur Zeit dieser Arbeit, gebräuchlichsten Chromatographieverfahren einander gegenübergestellt (47).

Die Technik mit Sephadex LH-20 bringt im Vergleich zur Papier- und Dünnschichtchromatographie deutlich geringere Verluste, die bei den beiden letzteren Verfahren dadurch verursacht werden, daß Substanzen am Ort des Auftragens zurückbleiben. Bei der Verwendung von Sephadex LH-20 können darüberhinaus wesentlich größere Mengen der Substanzgemische aufgetragen werden. Der Einfluß der Chromatographie auf die Adsorption der freien Steroide an die Kohle im RIA konnte durch Zugabe von steroidfreiem Säuleneluat zu den Standardkurven ausgeglichen werden und erlangte damit in der Praxis keine Bedeutung (3.3.2.).

Ein großer Vorteil der Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 liegt in der Tatsache, daß sie mechanisiert werden kann. Obwohl die Mechanisierung immer dann notwendig oder zumindest wünschenswert erscheint, wenn mehr als zwei Steroide in einer Probe bestimmt werden sollen, gibt es bisher nur wenige Berichte über mechanisierte

TECHNIK	VORTEILE	NACHTEILE	BLANKS	METHODEN ZUR BESEITIGUNG DER BLANKS
Papierchromatographie	- vielseitig anwendbar	- langsam - erfordert strenge Umgebungskontrolle - schwankende Wiederfindungen	- niedrig mäßig	- Waschen des Papiers - Destillieren der Lösungsmittel
Dünnschichtchromatographie	- vielseitig anwendbar	- Anwendung und Elution mühsam - Blankproblem	- hoch	- schwierig
Säulenchromatographie	- vielseitig anwendbar - schnell - hohe Wiederfindung - gute Reproduzierbarkeit - Sephadex kann gereinigt und wiederverwendet werden	- Packen der Säulen	- niedrig	- Destillieren der Lösungsmittel - Zugabe von Laufmittel zu den Standards

Tab. 15 Vor- und Nachteile einiger Methoden der Trennung von Steroidhormonen

Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 (16, 56, 64). Die besonders in den USA weit verbreitete Methode der Flüssigkeitschromatographie auf Celit-Säulen kann schon deshalb kaum mechanisiert werden, da die Säulen vor jeder Elution neu gepackt werden müssen (66).

Wesentliche Voraussetzung für die Mechanisierung eines chromatographischen Verfahrens ist die gute Reproduzierbarkeit der Elutionsmuster. Unter den Voraussetzungen eines gleichbleibenden kleinen Volumens beim Auftragen auf die Säulen (möglichst schmale Startzone), konstanter, möglichst niedriger Umgebungstemperatur und gleichbleibender Flußrate konnten konstante Elutionsvolumina über einen Zeitraum von 10 Monaten gewährleistet werden, ohne daß die Säulen neu gepackt werden mußten (3.2.3.). Ein weiterer Hinweis auf die gute Reproduzierbarkeit war die geringe Abweichung der Wiederfindungen nach der Chromatographie (3.2.5.1., Tab. 4).

Bei Verwendung eines wenig polaren Laufmittels (Dichlormethan/ Methanol = 98/2, v/v) ist Sephadex LH-20 stark polarisiert. Unter diesen Bedingungen ist die Trennung der NNR-Steroide entsprechend ihrer Polarität als Hauptmechanismus des Chromatographiesystems anzusehen (3.2.3., Abb. 12). In Abhängigkeit der Zahl der Hydroxyl- und Keto-Gruppen der Steroide kommt es zu unterschiedlich starker Bindung der Substanzen über Wasserstoffbrücken an die polaren Gruppen des Gels. Die Gelfiltration ist bei dem hier beschriebenen System ohne große praktische Bedeutung. Das von ENEROTH und NYSTRÖM beschriebene Phänomen des "Keto-Ausschluß" läßt sich wohl am ehesten durch die geringere Ladungsverteilung am Sauerstoff in der Doppelbindung im Vergleich zu der Hydroxylgruppe und damit geringere Elektronegativität der Keto-Gruppe erklären (25). Obwohl es bis jetzt noch keine befriedigende Erklärung aller Trennungsmechanismen dieses

Chromatographiesystems gibt, erweist sich diese Technik als das wohl geeignetste Verfahren zur gleichzeitigen Isolierung einer Reihe von NNR-Steroiden (25, 47, 48).

Das von MURPHY angegebene System zur Chromatographie von NNR-Steroiden erwies sich nach Verlängerung der Säulen von 40 auf 60 cm als praktikable Technik zur Isolierung von Aldosteron aus Plasmaextrakten (47). Durch die gleichzeitig gute Trennung von 11-Deoxycortisol, Cortison und Cortisol ergab sich die Möglichkeit, diese Substanzen zusätzlich in derselben Probe zu bestimmen.

Corticosteron und Testosteron überschneiden sich zu etwa 33%. Unter bestimmten Bedingungen ist dennoch die spezifische Messung von Corticosteron möglich, da einerseits die Kreuzreaktion von Testosteron mit dem Corticosteron-Antiserum minimal ist und andererseits im Kindesalter relativ niedrige Plasmaspiegel von Testosteron zu erwarten sind.

Progesteron, 11-Deoxycorticosteron und 17-Hydroxyprogesteron ließen sich mit dem hier beschriebenen Chromatographiesystem nicht voneinander trennen. Aufgrund der hohen Wiederfindung dieser Substanzen scheint es sinnvoll und möglich, diese in einem zweiten, nachgeschalteten Chromatographieschritt voneinander zu isolieren (27).

Wichtiges Kriterium eines Chromatographiesystems ist dessen Auflösung oder resolution factor (R_s). Der Koeffizient (R_s) gibt an, wieviel Prozent der gesamten Steroidfraktion durch benachbarte Substanzen verunreinigt sind (2.6.3.2.). Leider liegen hierzu in der Literatur über vergleichbare Chromatographiesysteme keine Angaben vor, doch zeigen bereits die Elutionsmuster der Arbeiten von MURPHY (47) und WALDHÄUSL et al. (78), daß die Auflösung bei einer

Säulenlänge von 40 cm schlechter sind. Die durch die längere Säule bedingte größere Elutionsdauer ist verglichen mit der besseren Trennung der Substanzen unwesentlich. Die Zeit für eine Chromatographie einschließlich spülen der Säulen mit Laufmittel betrug vier Stunden, so daß an einem Arbeitstag zwei Elutionen von 6 parallelen Säulen durchgeführt werden konnten, was der Auftrennung von 12 Plasmaextraktionen in insgesamt 36 reine Steroidfraktionen entspricht.

Steroide	Elutions-muster (Gesamtpeak)	mechanisierte Chromatograph. (ohne Rand-fraktionen)	Literatur
Corticosteron	81,0%	66,0%	63,2% (72) 79,5% (79)
Aldosteron	78,0%	64,0%	56,5% (34) 44,7% (78) 51,9% (72)
Cortisol	75,0%	49,5%	76,6% (72)

Tab. 16 Eigene Wiederfindungen im Vergleich mit Angaben aus der Literatur

In der Tab. 16 sind die eigenen Wiederfindungen (sowohl bei der Festlegung der Elutionsmuster als auch bei der mechanisierten Chromatographie) denjenigen aus der Literatur gegenübergestellt. Die Wiederfindungen bei der mechanisierten Chromatographie waren trotz der Verluste durch Elimination der Randfraktionen der Peaks mit den An-

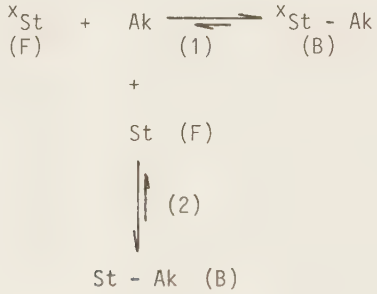
gaben aus der Literatur durchaus vergleichbar bzw. lagen für Aldosteron sogar deutlich darüber. Für Cortisol waren sie nur deshalb kleiner, weil zur Verringerung der Blanks im RIA und aus technischen Gründen von diesem Steroid nur die Mittelfraktionen aufgefangen wurden.

18-Hydroxycorticosteron ist die direkte Vorstufe von Aldosteron bei der Biosynthese in der NNR (Abb. 1). Bei extrem seltenen angeborenen Enzymdefekten läßt es sich in meßbaren Konzentrationen nachweisen. So beim Methyl-Oxydasedefekt Typ II in der Zona glomerulosa und beim Defekt der 17-Hydroxylase in der Zona fasciculata (72, 73). Für diese Arbeit stand 18-Hydroxycorticosteron nicht zur Verfügung. Aufgrund seiner Struktur ist damit zu rechnen, daß es im Bereich von Aldosteron und Cortison eluiert wird, d.h. daß es zu einer Überlappung mit diesen beiden Substanzen kommen kann. Außerdem müssen beachtliche Kreuzreaktionen dieser Substanz mit dem Aldosteron- und Cortison-Antiserum erwartet werden. Solange keine exakten Ergebnisse des Elutionsvolumens (V_e) und der Kreuzreaktion vorliegen, sollte die hier beschriebene Technik bei Verdacht auf die oben erwähnten Enzymdefekte keine Anwendung finden.

4.3. Radioimmunoassay

4.3.1. Arbeitsweise

Der RIA ist eine Form der kompetitiven Proteinbindungsanalysen aus der Gruppe der Sättigungsanalysen. Die Bindung von endogenem (St) und radioaktivem Steroid (^{X}St) an das Antiserum (Ak) stellt chemisch eine Gleichgewichtsreaktion dar, die nach dem Massenwirkungsgesetz abläuft (2.7.2.).



F freie Substanz
B antikörpergebundene Substanz

Radioaktiv markiertes (^{X}St) und endogenes Steroid (St) konkurrieren um die freien Bindungsstellen eines spezifischen Antiserums (Ak); ein Prinzip, das aus der Enzymanalyse als kompetitive Hemmung bekannt ist.

Technisch müssen zwei Formen der Inkubation unterschieden werden:

1. Reaktion (1) und (2) laufen gleichzeitig ab, wie in dieser Arbeit. Nur in diesem Fall kann von kompetitiver Hemmung gesprochen werden.

2. Schrittweise Inkubation ("pre-incubation assay"). Die Reaktionen (1) und (2) werden nacheinander (schrittweise) durchgeführt. Diese Form stellt keine kompetitive Hemmung dar (54).

Bei der schrittweisen Inkubation reagieren zuerst endogenes Steroid und Antiserum miteinander ("pre-incubation"). Der Antikörper wird im Überschuß zugegeben und bindet praktisch alle Substanz, wobei er selbst nur teilgesättigt ist. Das Gleichgewicht ist ganz zur rechten Seite verschoben. Danach wird das tritiierte Steroid zugegeben und erneut inkubiert. Die Zeit für diese Reaktion ist so bemessen, daß die noch freien Bindungsstellen des Antiserums durch (^{x}St) besetzt werden, aber noch keine meßbare Dissoziation der Komplexe (St-Ak) stattfindet (54).

Diese Methode eignet sich besonders zur Messung sehr geringer Konzentrationen, da durch die "pre-incubation" die Empfindlichkeit der Standardkurve (S_s) deutlich verbessert werden kann. Darüber hinaus läßt sich eine größere Spezifität erreichen, was sich in einer stärkeren Linearität der Standardkurve in bestimmten Bereichen nach der Transformierung ausdrückt (54). Entscheidend dabei ist, daß die Zeit des zweiten Reaktionsschrittes konstant gehalten wird, was sich mit steigender Zahl der Proben immer schwieriger gestaltet und dazu führt, daß für Proben und Standards nicht mehr exakt gleiche Bedingungen gegeben sind. Dies kann Ursache für einen systematischen Fehler sein. Die schrittweise Inkubation ist zeit- und arbeitsaufwendig.

Bei der guten Spezifität der Aldosteron- und Cortisol-Antiseren, zumal in Verbindung mit der Chromatographie, ließ dieses Verfahren keine besseren Ergebnisse dieser beiden RIAs erwarten, wohl hätte es aber den Arbeitsaufwand erheblich erhöht.

Für den Corticosteron-RIA, für den kein spezifisches Antiserum zur Verfügung stand, wurde dieses Verfahren diskutiert. Ein Ziel dieser Arbeit war es, möglichst viele Proben in einem RIA-Ansatz zu verarbeiten und aus Gründen der Rationalisierung das gleiche Arbeitsschema für die drei Assays zu verwenden. Außerdem war die Gewinnung eines spezifischen Corticosteron-Antiserums in Vorbereitung, so daß auch in diesem Fall auf die schrittweise Inkubation verzichtet wurde.

Die Inkubationstemperatur von 37^{oC} entspricht den physiologischen Bedingungen immunologischer Reaktionen. Um die Kontakte zwischen den Steroiden und den Bindungsstellen der Antiseren zu verbessern, wurde vorsichtig geschüttelt, so daß die bereits bestehenden Komplexe dadurch nicht wieder gelöst wurden, wohl aber die Durchmischung besser war. Die Ruheinkubation bei 0^{oC} im Eis-Wasser-Bad diente der Stabilisierung der Komplexe.

Aus Gründen der Rationalisierung der Methode wurde für die drei Assays dasselbe Arbeitsschema verwendet. Anhand der Reproduzierbarkeit der einzelnen RIAs (within assay precision) wurde die Zulässigkeit dieses Verfahrens überprüft. Die Ergebnisse zeigten, daß dies gerechtfertigt ist (3.4.2., Tab. 12). Damit war eine wesentliche Vereinfachung und Zeitersparnis erreicht, die eine breitere Anwendbarkeit dieser Methode für die Routine ermöglichte.

4.3.2. Antiseren

Antiseren sind heterogen; ein Gemisch verschiedener Immunglobuline unterschiedlicher Konzentration, Affinität und Spezifität. Diese Tatsache kann u.U. eine Fraktionierung des Antiserums notwendig machen, um größere Spezifität zu erzielen (20).

Der sog. Titer eines Antiserums ist dem Produkt K_a(Ab) proportional, d.h. der Affinitätskonstante (K_a) und der molaren Konzentration der freien Antikörperbindungsstellen (Ab) - freien Antikörperkonzentration (3). Ein hoher Titer kann somit entweder Hinweis auf gute Affinität oder eine hohe Antiserumkonzentration sein.

Zwischen Titer und Spezifität besteht keine direkte Beziehung. In der Praxis wird in der Regel das Antiserum mit dem höchsten Titer verwendet, da pro Messung weniger Antikörpermenge benötigt wird und so mehr Bestimmungen durchgeführt werden können. Dies ist von Bedeutung, da spezifische Antiseren gegen Steroide häufig nur in sehr kleinen Mengen zur Verfügung stehen. Bei den hier verwendeten Verdünnungen 1 : 10000 ist diese praktisch wichtige Eigenschaft gegeben.

In dieser Arbeit fanden ein C_{21}-Antiserum gegen Aldosteron (VECSEI) und ein C_{21}-Antiserum gegen Cortisol (BINDLINGMAIER) Verwendung. Mangels eines spezifischen Antikörpers wurde im Corticosteron-RIA die Kreuzreaktion des Cortisol-Antiserums benutzt. Es ist bekannt, daß die Spezifität entscheidend durch die Spezies des Tieres und innerhalb einer bestimmten Tiergruppe wiederum durch das einzelne Tier beeinflußt wird. Dies kann als Erklärung dafür dienen, daß das Cortisol-Antiserum höhere Kreuzreaktionen zeigt als das von Aldosteron, obwohl die Koppelung des Haptens an das Trägereiweiß am selben Kohlenstoffatom (C_{21}) stattgefunden hatte. Durch Koppelung an C_3 wurde versucht, ein spezifischeres Aldosteron-Antiserum zu gewinnen. Die Titer waren jedoch noch so niedrig, daß dieser Anti-

körper in dieser Arbeit noch keine Verwendung fand. Die Kreuzreaktionen waren jedoch wie erwartet geringer als die des hier benutzten Aldosteron-Antiserums.

Aus den Kreuzreaktionen der beiden Antiseren (Tab. 9) ist ersichtlich, daß eine gute Spezifität des RIA erst in Verbindung mit der Chromatographie gegeben ist (4.3.5.).

4.3.3. Das Aktivkohle-Trennungsverfahren

Um nach der Inkubation im RIA die antikörpergebundene Radioaktivität zählen zu können, müssen die freien Steroide aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Hierzu wurde in dieser Arbeit die Adsorption der freien Substanzen an Kohle mit einer Aktivkohle-Dextran-Suspension verwendet, die aufgrund ihrer Vorteile die allgemein bevorzugte Methode ist (Tab. 2). Die Adsorption an die Aktivkohle stellt chemisch gesehen eine Gleichgewichtsreaktion dar, die in erster Linie konzentrationsabhängig ist und von der Reaktionszeit praktisch nicht beeinflußt wird (53). Das Dextran dient der Stabilisierung der Aktivkohle in der Lösung.

Drei Faktoren müssen als entscheidende Fehlerquellen der Kohleadsorption Beachtung finden:

1. Die Adsorption von Eiweißmolekülen.
   In Abhängigkeit der Reaktionszeit und der Konzentration des Adsorbens kann es zur Bindung von Eiweißmolekülen (Antigen-Antikörper-Komplexen) kommen (35). Diese Tatsache ist beim Arbeiten mit geringen Konzentrationen (sehr großen Antiserumverdünnungen) von entscheidender Bedeutung.

Mit der Adsorption von Eiweißmolekülen ist etwa 20 Minuten nach Zugabe der Aktivkohle zu rechnen, wenn die Adsorptionsrate der Steroide ihr Maximum (nach 15 Minuten) vereits erreicht hat (35, 53). Durch Hinzufügen von indifferenten Eiweißmolekülen (Gammaglobulinen) zum Reaktionsgemisch kann im Falle der Bindung von Proteinen die Wahrscheinlichkeit der Adsorption der spezifischen Komplexe erheblich gesenkt werden.

2. Die Dissoziation der bereits gebildeten Antikörperkomplexe.
Die immunologische Reaktion ist in erster Linie zeit- und temperaturabhängig. Hingegen spielt die Temperatur bei der Kohleadsorption praktisch keine Rolle. Sie wird hauptsächlich von der Konzentration des Adsorbens und der Zeit bestimmt. Deshalb kann sie bei niedriger Temperatur (0^{oC} im Eis-Wasser-Bad) durchgeführt werden, bei der die bereits gebildeten spezifischen Komplexe relativ stabil sind. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Gleichgewichtsreaktion der Antikörperbindung nimmt mit der Temperatur ab. Wird die Kohleadsorption bei niedriger Temperatur ausgeführt und die Reaktionszeit möglichst kurz gehalten, kann die Dissoziation der Antikörperkomplexe praktisch ausgeschlossen werden.

3. Die Konzentration des Adsorbens.
Die Kohleadsorption ist im wesentlichen konzentrationsabhängig (53). Deshalb muß zu jeder Probe exakt die gleiche Menge pipettiert werden. Läßt man die Aktivkohle-Dextran-Suspension stehen, setzt sie sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften am Grund des Gefäßes ab. Deshalb ist während des Pipettierens der Aktivkohle für eine ständige, gleichmäßige Durchmischung zu sorgen.

Die genannten Fehlermöglichkeiten wurden durch die folgenden Maßnahmen vermieden. Während des Pipettierens der Aktivkohle wurde das Vorratsgefäß ständig mit einem Magnetrührer durchmischt. Die Reaktion

wurde bei 0^{oC} im Eis-Wasser-Bad ausgeführt, die Zeit auf 15 Minuten festgesetzt und durch Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge beendet.

Die Überstände mit den antikörpergebundenen Steroiden konnten nach dem Zentrifugieren durch einfaches Dekantieren in die Szintillationsgefäße übergeführt werden. Eine exakte zeitliche Begrenzung des Dekantierens ist nicht nötig, da durch das Zentrifugieren die Aktivkohle von den Antikörperkomplexen getrennt und die Adsorption damit bereits beendet war.

Im Vergleich mit den übrigen Adsorptionsverfahren weist die Kohle entscheidende Vorteile auf. Florisil zeigt in verschiedenen Chargen unterschiedliche Adsorptionseigenschaften. Die Festkörpertechniken mit Polystyrol oder Polypropylen benötigen relativ große Mengen der Antiseren, die für Steroide meist nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen. Im Gegensatz zur Aktivkohle-Dextran-Suspension, bei der die Fraktion des Antiserums mit dem größten K_a(Ab)-Produkt, unabhängig von ihren physiko-chemischen Eigenschaften, den stärksten Einfluß auf die Charakteristik des Antiserums hat, findet bei der Festkörpermethode die Adsorption entsprechend den physiko-chemischen Eigenschaften und unabhängig vom Produkt K_a(Ab) statt. Dies kann als Erklärung dafür dienen, daß bei den Festkörperverfahren eine Abnahme der Affinität und Spezifität im Vergleich mit der Kohle beobachtet wurde (3). Die Aktivkohle ist deshalb das geeignetste Verfahren zur Trennung der freien von den antikörpergebundenen Steroiden sowohl bei der Bestimmung des Titers als auch für den RIA.

4.3.4. Das Blankproblem

Der Blank oder Probenleerwert des RIA stellt einen unspezifischen und unerwünschten Effekt dar, der die Meßergebnisse verfälscht.

Faktoren, die die Reaktion mit den Antiseren beeinflussen, sind Ursachen positiver Probenleerwerte; Faktoren, die bei der Kohleadsorption interferieren, solche negativer Blanks (2.7.6.1.). Kein RIA erfüllt die Bedingungen der Zuverlässigkeit ohne gleichzeitige Bestimmung des Blanks (1).

Die Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 und Dichlormethan/Methanol (98/2, v/v) führt im Vergleich zu den meisten anderen zur Trennung von Steroiden verwendeten Methoden zu den niedrigsten Blanks (47). Dies besonders, wenn Lösungsmittel des Reinheitsgrades p.a. verwendet werden, da viele Faktoren, die einen Reagenzienleerwert bedingen, rein chemischer Natur sind und daher problemlos vermieden werden können. Alle Glaswaren, mit Ausnahme der Säulen, wurden mehrfach mit techn. Methanol vor- und mit Aqua bidest. nachgespült, bevor sie mit Aluminiumfolie verschlossen ausgeglüht wurden (38). Dadurch konnten sowohl negative als auch positive Blanks, bedingt durch Rückstände von Detergentien, Alkali, Steroiden usw. vermieden werden.

Unter Einhaltung all dieser Maßnahmen muß dennoch mit einem Einfluß des Chromatographiesystems auf den RIA gerechnet werden. In einem Assayansatz, also unter exakt gleichen Bedingungen, wurden zwei Standardkurven, eine mit und eine ohne steroidfreies Säuleneluat, bestimmt (3.3.2.). Dabei ergab sich bei Verwendung von steroidfreiem Eluat eine mittlere Abnahme der Bindung um etwa 5%, was zu negativen Blanks führte. Ursache dafür ist die Interferenz von Substanzen der Chromatographie mit der Kohleadsorption. Erst die Zugabe von steroidfreiem Säuleneluat zu den Standards garantiert exakt gleiche Bedingungen für Proben und Standardkurven.

Als Blanks wurden sowohl Proben mit steroidfreiem Plasma als auch mit destilliertem Wasser in jeden RIA eingesetzt. Sie wurden wie unbekannte Proben behandelt, durchliefen Ansatz, Extraktion,

Chromatographie und RIA. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den beiden Methoden.

Die Probenleerwerte lagen für alle drei Steroide unter der Empfindlichkeit des RIA und blieben aus diesem Grund bei der Berechnung der Proben unberücksichtigt (1).

4.3.5. Die Spezifität des RIA

Die Spezifität des RIA wird von folgenden Faktoren beeinflußt:

1. Durch das Auflösungsvermögen der Chromatographie (2.6.3.2.).
2. Durch die Spezifität des Antiserums - dessen Kreuzreaktionen mit den übrigen Steroiden (2.7.3.4.).
3. Durch die Plasmaspiegel der Steroide, bei unzureichender Auflösung der Chromatographie bzw. beim RIA ohne vorausgegangene Trennung der Substanzen.

Die Chromatographie auf der 60 cm Säule mit Sephadex LH-20 und Dichlormethan/Methanol (98/2, v/v) liefert die vollständige Trennung von 11-Deoxycortisol, Aldosteron, Cortison und Cortisol (3.2.1., Abb. 11). Allein schon dadurch ist die sehr gute Spezifität dieser Assays gewährleistet.

Zwischen Testosteron und Corticosteron kommt es zu einer Überschneidung von etwa 30% der beiden Fraktionen (3.2.1.). Hier hängt die Spezifität des RIA entscheidend von den Kreuzreaktionen des Antiserums gegen Corticosteron und von den Plasmaspiegeln des Androgens ab. Sind die Plasmakonzentrationen von Testosteron sehr niedrig, wie z.B. beim weiblichen Geschlecht oder beim männlichen vor der Pubertät, so kann diese Methode ohne Einschränkungen zur

Bestimmung von Corticosteron unter physiologischen Bedingungen Verwendung finden. In Plasmen von Männern nach der Pubertät, beim Adrenogenitalen Syndrom und bei hormonaktiven Tumoren der NNR muß aber durch hohe Testosteronkonzentrationen mit bedingten Fehlern gerechnet werden. Deshalb sollte die hier beschriebene Methode für Corticosteron unter diesen Bedingungen vorläufig nicht eingesetzt werden.

In diesen Fällen kann Corticosteron nur dann gemessen werden, wenn ein spezifischeres Antiserum zur Verfügung steht, dessen Kreuzreaktion mit Testosteron deutlich unter 0,1% liegt.

4.4. Qualitätsmerkmale der Methode

Richtigkeit (accuracy) und Reproduzierbarkeit (precision) der Meßergebnisse sind die wichtigsten Kriterien für die Interpretation und den Vergleich von Werten, besonders wenn diese über einen längeren Zeitraum (in verschiedenen Analysengängen) gewonnen wurden.

4.4.1. Die Richtigkeit der Methode (accuracy)

Fehler bei der Analyse führen zu einer Differenz zwischen den Meßergebnissen und den tatsächlichen Plasmaspiegeln. Die Zahl der Fehlerquellen ist der der Einzelschritte des Analysenganges direkt proportional. Können systematische Fehler ausgeschlossen werden, so sind diese Fehlerquellen hauptsächlich methodischen oder menschlichen Ursprungs (1). Ein systematischer Fehler ist zum Beispiel in zu kurzer Äquilibrierungszeit der radioaktiven Steroide mit den Plasmen vor der Extraktion zu sehen (52). Mit Hilfe der Richtigkeit (accuracy) sollte die Differenz zwischen den Meßergebnissen und den tatsächlichen Steroidkonzentrationen der Plasmaproben ermittelt werden.

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Techniken unterscheiden sich lediglich in ihrer Aussagekraft.

1. Zu steroidfreiem Plasma (2.1.) bzw. Gammaglobulin-Borat-Puffer (2.1.) wurden definierte Mengen der Steroide zugesetzt. Die Proben durchliefen die gesamte Analyse. Die Ergebnisse können unterschiedlich dargestellt werden. Einmal wurde die wiedergefundene Menge in Prozent der eingesetzten berechnet (2.8.1., Tab. 11). Zum anderen wurden in einem Diagramm eingesetzte gegen wiedergefundene Menge aufgetragen und sowohl der Korrelations- wie auch

der Regressionskoeffizient berechnet. Während die Korrelation nur dem Nachweis der linearen Beziehung zwischen beiden Größen diente, ergab der Regressionskoeffizient, daß sich bei Änderung der eingesetzten Menge um einen bestimmten Betrag, sich die wiedergefundene um denselben Betrag ändert. Dadurch wird die große Genauigkeit dieser Methode bestätigt.

Steroide	eigene Ergebnisse	Literatur
Corticosteron	94,0 - 97,5%	96,7% (43)
Aldosteron	95,0 - 104,0%	92,0% (17)
Cortisol	99,5 - 102,5%	102,0% (43)

Tab. 17 Richtigkeit der Methode (accuracy). Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur.

In Tab. 17 sind die eigenen Ergebnisse der Richtigkeit Angaben aus der Literatur gegenübergestellt. Dabei wurden widergefundene Mengen in Prozent der eingesetzten Steroidkonzentration angegeben. Ein Unterschied zwischen der Verwendung von steroidfreiem Plasma und Gammaglobulin-Borat-Puffer konnte nicht festgestellt werden.

2. Die Verwendung eines Plasmapools zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode (accuracy) ist weit weniger aussagekräftig. Hiermit läßt sich zwar, ebenso wie bei der o.g. Technik eine eindeutig lineare Beziehung zwischen eingesetzten Poolvolumina und gemessenen Steroid-

konzentrationen nachweisen - Korrelationskoeffizient praktisch gleich +1. Die Berechnung der Regressionskoeffizienten ist hierbei aber nicht sinnvoll und aussagekräftig, da unterschiedliche Dimensionen (Volumina und Mengen) miteinander verglichen werden. Deshalb sollte diese Technik zum Nachweis der Richtigkeit allein nicht angewendet werden.

4.4.2. Die Reproduzierbarkeit der Methode (between assay precision)

Die Reproduzierbarkeit der Methode (between assay precision) beschreibt die Streuung der Meßergebnisse einer Probe, die in mehreren Analysengängen bestimmt wurde, um einen Mittelwert und wird als Variationskoeffizient (CV) angegeben. Sie ist das wichtigste Kriterium für den Vergleich von Meßergebnissen, die über einen längeren Zeitraum

Steroide	eigene Reproduzierbarkeit (between assay)	Literatur Sephadex LH-20	Literatur Papierchromatographie
Corticosteron	12,8 - 15,9%		5 - 13% (79)
Aldosteron	10,6 - 12,2%	20,0% (78) 11,0% (35)	7,3% (35 4,7-21% (34) 14,0% (7)
Cortisol	6,3 - 8,6%		15,0% (79)

Tab. 18 Die Reproduzierbarkeit der Methode (between assay precision). Vergleich eigener Werte mit der Literatur.

gewonnen wurden. Ebenso wie die Richtigkeit der Methode (accuracy) ist sie von der Zahl der Einzelschritte des Analysenganges abhängig (Ansatz, Extraktion, Chromatographie und RIA).

Die konstant hohe Wiederfindung nach zweimaliger Extraktion mit Dichlormethan in einem Volumenverhältnis von Plasma/Lösungsmittel = 1/10 und die hohe Reproduzierbarkeit des RIA (within assay precision) haben praktisch keinen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der Methode (4.2., 4.3.1.). Sie ist damit entscheidend von der Reproduzierbarkeit der Chromatographie und den Wiederfindungen nach der Chromatographie abhängig. Wie gezeigt, war die Reproduzierbarkeit der Chromatographie selbst unter den Bedingungen der Mechanisierung sehr gut (3.2.3., 3.2.6.). Somit hat die Wiederfindung den stärksten Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der Methode (between assay precision). Sie ist der Wiederfindung umgekehrt proportional. Legt man z.B. eine Wiederfindung von 50% der eingesetzten Menge zugrunde, so verdoppelt sich der Fehler bei der Hochrechnung. Bei nur 40% wiedergefundener Menge beträgt der Faktor bereits 2,5. Es sind deshalb möglichst hohe Wiederfindungen bei der Chromatographie anzustreben.

In Tab. 18 sind die Ergebnisse der Reproduzierbarkeit dieser Arbeit (CV) denen aus der Literatur gegenübergestellt. Für Corticosteron und Cortisol fanden sich keine vergleichbaren Arbeiten mit Säulenchromatographie auf Sephadex LH-20. In diesen Fällen wurden Methoden mit Papierchromatographie angegeben. Entsprechend den unterschiedlichen Fehlern beim Ablesen in verschiedenen Bereichen der Standardkurve, finden sich keine einheitlichen Variationskoeffizienten für alle Plasmakonzentrationen. Es ist zu erkennen, daß die hier beschriebene Methode in bezug auf die Reproduzierbarkeit anderen Arbeiten durchaus vergleichbar, z.T. sogar überlegen ist.

4.5. Auswertung der Meßergebnisse

Mangels geeigneter Rechner mußte ich mich auf die manuelle Auswertung der Meßergebnisse beschränken, was wegen der anfangs geringen Zahl der Proben möglich war. Diese manuelle Methode ist zeitaufwendig und fehlerhaft, bedingt durch die rechnerische Aufbereitung der primären Meßergebnisse, das Ablesen der unbekannten Konzentrationen an den graphischen Bezugskurven (Standardkurven) und die sehr grobe Näherung der Standardkurven durch Linearisierung mit Hilfe der reziproken, antikörpergebundenen Radioaktivität ($\frac{1}{cpm}$).

Der Einsatz radioimmunologischer Bestimmungsmethoden in der Routine von Klinik und Forschung macht aber die Vereinfachung durch maschinelle Auswertung notwendig,die darüber hinaus bessere Näherungsverfahren der Dosis-Wirkungskurven (Standardkurven) ermöglicht.

Hierfür stehen mehrere Techniken zur Verfügung. Bisher wurde meist die Näherung mittels Polynomen durchgeführt. Das älteste, am weitesten verbreitete Verfahren, ist die logit-log-Transformation, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableitet (77). Doch schon die große Zahl der Modifikationen zeigt, daß damit das Problem der Näherung der Standardkurven bisher nicht befriedigend gelöst werden konnte (77). MARSCHNER hat ein auf der Splineapproximation von REINISCH basierendes Verfahren empfohlen (41). Durch den Verzicht auf eine feste Formelfunktion ermöglicht die Spline-Funktion eine ungewöhnlich genaue Nachbildung unterschiedlichster Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Außerdem wird dadurch vermieden, daß, wie bei der logit-log-Transformation möglich, ein RIA aufgrund einer schlecht approximierbaren Standardkurve verworfen werden muß.

4.6. ACTH- und Dexamethason-Test

Es war nicht das Ziel dieser Arbeit, eine Aussage über Normalwerte und den 24-Stundenrhythmus der NNR-Steroide im peripheren Plasma zu machen. Die beiden Tests dienten als Nachweis der Zuverlässigkeit der Methode und stellten den Bezug zur praktischen Anwendung in Klinik und Forschung her. Die gemessenen Plasmaspiegel liegen innerhalb der in der Literatur angegebenen Bereiche, was als Bestätigung dieser Methode gewertet werden kann.

Alle drei Steroide zeigten die erwartete Stimulation der Biosynthese durch ACTH (26). Die vergleichsweise starke Zunahme von Corticosteron gegenüber Aldosteron kann durch den schwachen Einfluß des adrenocorticotropen Hormons ACTH auf die mitochondriale 18-Hydroxylaxe/Dehydrogenase erklärt werden, die die Umwandlung von Corticosteron in Aldosteron katalysiert (Abb. 1).

Corticosteron und Cortisol zeigten die erwartete Abnahme der Biosynthese nach Suppression der ACTH-Sekretion durch Dexamethason (26). Für Aldosteron hingegen fand sich ein Anstieg der Plasmaspiegel, der auch in weiteren Untersuchungen bestätigt werden konnte (21).

Die Corticosteronspiegel müssen mit Vorbehalt interpretiert werden. Für den Radioimmunoassay dieses Steroids fand die Kreuzreaktion des Cortisolantiserums Verwendung. Ein spezifisches Corticosteronantiserum ist in Vorbereitung, konnte aber in dieser Arbeit noch nicht verwendet werden. Wie die Vorversuche zeigen, ist seine Kreuzreaktion mit Testosteron jedoch so gering, daß damit die Corticosteronbestimmung ohne Rücksicht auf Testosteronspiegel möglich scheint.

5. Anwendbarkeit der Methode

Im peripheren Plasma können Aldosteron, Cortisol und Corticosteron simultan gemessen werden. Die dazu benötigten geringen Plasmavolumina (250 - 2000 µl) lassen diese Technik besonders für die Pädiatrie, Neonatologie und für Meßreihen, die häufige Probeentnahmen erfordern (Tagesprofile, klinische Prüfung von Arzneimitteln mit Wirkung auf die NNR-Funktion etc.), geeignet erscheinen. Aufgrund des hohen apparativen und finanziellen Aufwandes und der Verwendung von radioaktiven Substanzen kann sie i.a. jedoch nur in entsprechenden endokrinologischen Zentren in der Routine und Forschung Einsatz finden.

Mit der Chromatographie lassen sich außerdem 11-Deoxycortisol und Cortison rein darstellen. Damit eröffnet diese Technik die Möglichkeit, bis zu 5 Steroide aus einer Plasmaprobe gleichzeitig zu isolieren.

Die Mechanisierung der Chromatographie und die Rationalisierung der Arbeitsschemata der Assays machen es möglich mit einem personellen Aufwand von nur zwei Assistenten täglich zwei Chromatographien durchzuführen und damit 48 Plasmen in einer Woche aufzuarbeiten. Das entspricht bei gleichzeitiger Analyse von nur drei Substanzen 144 Steroidanalysen, die bequem in einem RIA-Ansatz weiter verarbeitet werden können.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer neuen Methode zur simultanen Bestimmung von Corticosteron, Aldosteron und Cortisol im peripheren Plasma aus einer Probe. Hierfür sind nur geringe Plasmavolumina (250-2000 µl) nötig. Das Verfahren gliedert sich in zwei voneinander unabhängige Arbeitsgänge: Chromatographie und RIA.

Die vollständige Isolierung und Reinigung der NNR-Steroide 11-Deoxycortisol, Aldosteron, Cortison und Cortisol ist mit der Flüssigkeitschromatographie auf 60 cm Säulen mit Sephadex LH-20 und Dichlormethan/Methanol (98/2, v/v) möglich. Testosteron und Corticosteron können damit allerdings nicht ganz voneinander getrennt werden. Beide Fraktionen überschneiden sich um etwa 30%. Die Wiederfindungen bei der Festlegung der Elutionsmuster liegen im Bereich von 75 - 93%. Das Verfahren der Mechanisierung (6 parallellaufende Säulen) wird eingehend beschrieben. Sie führt zu einer geringen Verschiebung der Elutionsmuster der einzelnen Säulen, was die Reinheit der isoberten Steroide jedoch nur minimal beeinflußt. Unter mechanisierten Bedingungen werden die Randfraktionen der Steroide verworfen. Die Wiederfindungen liegen dann zwischen 50 und 66% bei guter Reproduzierbarkeit der Chromatographie. Die chromatographischen Trennungsmechanismen und deren theoretische Grundlagen werden ausführlich beschrieben und diskutiert, ebenso wie das Prinzip des Radioimmunoassay und die Eigenschaften der verwendeten Antiseren. Eingehend werden Empfindlichkeit der Standardkurven sowie der RIAs und die Blankprobleme untersucht. Die Empfindlichkeit des RIA beträgt 0,128 ng/ml für Corticosteron, 0,019 ng/ml für Aldosteron und 0,322 ng/ml für Cortisol. Die Blanks jedes der drei Assays sind kleiner als die Empfindlichkeit der jeweiligen Standardkurve, so daß sie unberücksichtigt bleiben können. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der RIAs (within assay precision, 2,5% für Corticosteron, 2,8% für Aldosteron und 3,4% für Cortisol) ist es zulässig, für jeden

Assay das gleiche Arbeitsschema zu verwenden. Die Zuverlässigkeit der Methode wird durch die Richtigkeit (accuracy) und die Reproduzierbarkeit (between assay precision) bewiesen.

Der Bezug zur praktischen Anwendung dieses Verfahrens in der Klinik wird am Beispiel des Stimmulationstests mit ACTH und des Suppressionstests mit Dexamethason demonstriert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ABRAHAM GE: Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. Clin Biochem 7: 193 (1974)

2. ABRAHAM GE: Radioimmunoassay of plasma steroid hormons. Modern methods in steroid analysis, Academic Press, Ed. HOFFMANN E (1973)

3. ABRAHAM GE: Radioimmunoassay of steroids in biological materials. Acta Endocr Suppl 183: 7 (1974)

4. ABRAHAM GE; SWERDLOFF R; TULCHINSKY D; ODELL WD: Radioimmunoassay of plasma progesterone. J Clin Endocr Metab 32: 619 (1971)

5. AFRICA R; HABER E: The production and characterisation of specific antibodies to aldosterone. Immunochemestry 8: 479 (1971)

6. APTER D; JÄNNE O; KARVONEN P; VIHKO R: Simultaneous determination of five sex hormones in human serum by radioimmunoassay after chromatography on Lipidex- 5000. Clin Chem 22: 32 (1976)

7. BAYARD F; BEITINS IZ; KOWARSKI A; MIGEON CJ: Measurement of plasma aldosterone by radioimmunoassay. J Clin Endocr Metab 31: 1 (1970)

8. BAYLY MJ; CATCH JR: The stabilty of labelled organic compounds. The Radiochemical Centre Amersham, Bucks, England, UK, RCC Review 3 (1968)

9. BARBIERA JM; THORNEYCROFT IH: Simultaneous radioimmunoassay of testosterone and dihydrotestosterone. Steroids 23: 757 (1974)

10. BEITINS IZ; KOWARSKI A; MIGEON CJ; GRAHAM GC: Adrenal function in normal infants and in marasmus and kwashiorkor. J Pediatr 86: 302 (1975)

11. BERSON SA; YALOW RS: General principles of radioimmunoassay. Clin Chim Acta 22: 51 (1968)

12. BINOUX MA; ODELL WD: Use of dextran-coated charcoal to separate antibody-bound from free hormone: A critpue. J Clin Endocr Metab 36: 303 (1973)

13. BLEDSOE T; ISLAND DP; RIONDEL AM; LIDDLE GN: Modification of aldosterone secretion and electrolyte excretion in man by a chemical inhibitor of 18-oxydation. J Clin Endocr Metab 24: 740 (1964)

14. BREUER H: Methodische Schwierigkeiten der Proteinbindungs-methoden zur Bestimmung von Steroidhormonen. Z Klin Chem Klin Biochem 11: 357 (1973)

15. BROWN RD; STROTT CA: Plasma deoxycorticosterone in man. J Clin Endocr Metab 32: 744 (1971)

16. BUCKLE JW; JACK PMB; NATHANIELSZ PW: Simultaneous separation of estrogens and prostaglandins on an automated column chromatography system using Sephadex LH-20. J Physiol 242: 56 (1974)

17. CAMERON EHD; JONES DA: Some observations on the measurement of estradiol-17β in human plasma by radioimmunoassay. Steroids 20: 737 (1972)

18. CAWSON MJ; ANDERSON ABM; TURNBULL AC; LAMPE L: Cortisol, Cortisone, and 11-deoxycortisol levels in human umbilical and maternal plasma in relation to the onset of labor. J Obstet Gyn Brit Comm 81: 737 (1974)

19. COLLINGS WP; MANSFIELD MD; ALLADINA NS; SOMMERVILLE IF: Radioimmunoassay of plasma testosterone. J Ster Biochem 3: 333 (1972)

20. Di PIETRO; BROWN RD; STROTT CA: A pregnenolone radioimmunoassay utilizing a new fraction technique for sheep antiserum. J Clin Endocr Metab 35: 729 (1972)

21. DÖRR HG; SIPPELL WG; HÖLLER W; BINDLINGSMAIER F; KNORR D: Effects of short term ACTH stimulation on plasma levels of eight corticosteroids and progestins in normal men and women. Acta Endocrinol, Suppl, im Druck (1981)

22. DOERR P: Hapten-radioimmunoassay of plasma oestradiol. Acta Endocrinol 72: 330 (1973)

23. EKINS RP; NEWMAN GB; PIYASENA R; BANKS P; SLATER JD: The radioimmunoassay of aldosterone in serum and urine: theoretical and practical aspects. J Ster Biochem 3: 289 (1972)

24. EMMENT Y; COLLINS WP; SOMMERVILLE IF: Radioimmunoassay of oestrone and oestradiol in human plasma. Acta Endocrinol 69: 567 (1972)

25. ENEROTH P; NYSTRÖM E: A study on liquid-gel partitition of steroids and steroid derivates on lipophilic sephadex gels. Biochem Biophys Acta 144: 149 (1967)

26. FEKETE G; GÖRÖG P: The inhibitory action of natural and synthetic glucocorticoids on adrenal steroidogeneses at the adrenal level. J Endocr 27: 123 (1963)

27. GOLDER WA; SIPPELL WG: Sephadex LH-20 multiple-column chromatography for the simultaneous separation of progesterone, deoxycorticosterone, and 17-hydroxyprogesterone from small plasma samples. J Chromatogr 123: 293 (1976)

28. HAMMOND GL; RUOKONEN A; KONTTURI M; KOSKELA E; VIHKO R: The simultaneous radioimmunoassay of seven steroids in human spermatic and peripheral venous blood. J Clin Endocr Metab 45: 16 (1977)

29. HENNAM JF; COLLINGS WP: A cost reductive method for the radioimmunoassay of plasma androstendione. A comparison of antisera and the effects of chromatography. Acta Endocrinol 76: 579 (1974)

30. HERBERT V; LAU K-S; GOTTLIEB CW; BLEICHER SJ: Coated charcoal immunoassay of insulin. J Clin Endocr Metab 25:1375 (1965)

31. HOLLMANN G: Experimentelle Untersuchungen zur Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks im frühen Kindesalter. Habilitationsschrift, Ludwig Maximilian-Universität München (1971)

32. HOLMDAHL TH; JOHANSSON EDB: Peripheral plasma levels of 17a-hydroxyprogesterone, progesterone, and oestradiol during normal menstrual cycles in women. Acta Endorinol 71: 743 (1972)

33. HONDA M: The simultaneous assay of progesterone, 17a-progesterone, and deoxycorticosterone in human plasma by competitive protein binding. Endocr Japon 23: 259 (1976)

34. ITO T; J; HANING R; HORTON R: A radioimmunoassay for aldosterone in human peripheral plasma including a comparison of alternate technique. J Clin Endocr Metab 34: 106 (1972)

35. KATZ FH; ROMFH P; ZIMMERING PE; KELLY WG: Radioimmunoassay of plasma aldosterone: effect of sexual differences and increasing duration of upright posture. Steroids Lipids Res 3: 90 (1972)

36. KLEIN GP; BADEN M; GIROUD CJP: Quantitative measurement and significance of five plasma corticosteroids during the perinatal period. J Clin Endocr Metab 36: 944 (1973)

37. KOLANOWSKI J: Simultaneous determination of cortisol, deoxycortisol, and corticosterone in plasma and urine by competitive protein binding assay. J Steroid Biochem 5: 55 (1974)

38. KNORR D: Ultrareine Glasgeräte durch Aufheizen bei 500°C. Z Klin Chem Klin Biochem 9: 175 (1971)

39. MALINOWSKA KW; NATHANIELSZ PW: The assay of corticoserone, cortisone, and cortisol in single sample obtained from fetal and neonatal animals. J Phys 233: 20 (1973)

40. MALVANO R; ROLLERI E; ROSA U: In radioimmunoassay and relate procedures. International Atomic Energy Agency, Wien 97 (1974)

41. MARSCHNER J; DOBY H; ERHART F; LANDESDORFER T; POPP B; RINGEL C; SCRIBA PC: Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels Spline-Funktion. Ärztl Lab 20: 184 (1974)

42. MARTIN BT; COOKE BA; BLACK WP: Evaluation of a rapid method for the measurement of plasma progesterone by competitive protein binding. J Clin Endocr Metab 46: 369 (1970)

43. MAYES D; FURUYAMA S; KEM DC; NUGENT CA: A radioimmunoassay for plasma aldosterone. J Clin Endocr Metab 30: 682 (1970)

44. MEIKLE AW; LAGERQUIST LG; TYLER FH: A plasma dexamethason radioimmunoassay. Steroids 22: 193 (1973)

45. MORE PH; AXELROD LR: A solid-phase radioimmunoassy for estrogen by estradiol-17ß-antibody covalently bound to a water insoluble synthetic polymer (ENZACRYL AA). Steroids 20: 199 (1972)

46. MURPHY BEP: Methodological problems in competitive protein binding techniques; the use of Sephadex column chromatography to separate steroids. Acta Endocrinol, Suppl 147: 37 (1970)

47. MURPHY BEP: "Sephadex" colum chromatography as an adjunct to competitive protein binding assay of steroids. Nature New Biology 232: 21 (1971)

48. MURPHY BEP; DIEZ D'AUX RC: The use of Sephadex LH-20 column chromatography to separate unconjugated steroids. J Ster Biochem 6: 233 (1975)

49. NEWSOME HH JR.; CLEMENTS AS; BORUM EH: The simultaneous assay of cortisol, 11-deoxycortisol, and cortisone in human plasma. J Clin Endocr Metab 34: 473 (1972)

50. NIESCHLAG E; LORIAUX DL; LIPSETT MB: Radioligand assay for Δ_5-3β-hydroxysteroids. Steroids 19: 669 (1972)

51. NIESCHLAG E; LORIAUX DL: Radioimmunoassay for plasma testosterone. Z Klin Chem Klin Biochem 10: 164 (1972)

52. NIESCHLAG E; WICKINGS EJ:A review of radioimmunoassay for steroids. Z Klin Chem Klin Biochem 13: 261 (1975)

53. OCHI Y; SHIOMI K; HACHIYA T; YOSHIMURA M; MIYAZAKI T: Dextran-coated charcoal technique to make the hormon-free serum as a diluent for standard curve of radioimmunoassay. Endocr Japon 20: 1 (1973)

54. PHILLIPS AP: The improvement of specificity in radioimmunoassay. Clinica Acta 44: 333 (1973)

55. PORATH J; FLODIN P: Gel filtration: a method for desalting and group separation. Nature 183: 1657 (1959)

56. POWELL JE; STEVENS VC: Simple radioimmunoassay of five unconjugated ovarian steroids in a single sample of serum or plasma. Clin Chem 19: 210 (1973)

57. RUDER HJ; RL; LIPSETT MB: A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. J Clin Endocr Metab 35: 219 (1972)

58. SACHS L: Statistische Methoden. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

59. SCHOOLEY DA; NAKANISHI K: Application of high pressure liquid chromatography to the separation of insect molting hormons. Modern Methods of Steroid Analysis, Academic Press, Ed. HOFFMANN E (1973)

60. SCHULSTER; BURSTEIN; COOKE: Molecular endocrinology of the steroid hormones. Wiley J a. sons, London, Sydney, Toronto (1976)

61. SEKIHARA H; OHSAWA N; IBAYASHI H: A radioimmunoassay for serum dehydroepiandrosterone sulfate. Steroids 20: 813 (1972)

62. Sephadex LH-20, chromatography in organic solvents. PHARMACIA FINE CHEMICALS.

63. SETCHELL KDR; SHACKLETON CHL: The group separation of plasma and urinary steroids by column chromatography on Sephadex LH-20. Clinica Chimica Acta 47: 381 (1973)

64. SIPPELL WG; LEHMANN P; HOLLMANN G: Automation of multiple Sephadex LH-20 column chromatography for simultaneous separation of plasma corticosteroids. J Chromatogr 108: 305 (1975)

65. SJÖVALL J; NYSTRÖM E; HAATHI E: Liquid chromatography on lipophilic Sephadex. Advan Chromatogr 6: 119 (1968)

66. STONE S; KHARMA KM; NAKAMURA RM; MISHELL DR Jr; THORNEYCROFT IH: A technique for the assay of 17-hydroxyprogesterone (17-hydroxy-4-pregnene-3,20-dione) in serum using celite column chromatography and competitive protein binding. Steroids 18: 161 (1971)

67. STROTT CA; LIPSETT MB: Measurement of 17-hydroxyprogesterone in human plasma. J Clin Endocr Metab 28: 1426 (1968)

68. TAN SY; MURLOW PJ: A competitive protein binding radioassay for deoxycorticosterone in human plasma. Steroids 25: 1 (1975)

69. TAN SY; MURPHY BEP: Plasma 17a-hydroxyprogesterone: an improved radioassay method. Steroids 25: 283 (1975)

70. TURNER JC: Sample preparation for liquid scintillation counting. The Radiochemical Centre Amersham, Bucks, England, UK; RCC Review 6

71. ULICK S; VETTER D: Simultaneous measurement of secretory rates of aldosterone and 18-hydroxycorticosterone. J Clin Endocr Metab 25: 1015 (1965)

72. ULICK S: Diagnosis and nomenclature of the disorders of the terminal portion of the aldosterone biosynthetic pathway. J Clin Endocr Metab 43: 92 (1976)

73. ULICK S: Normal and alternate pathway in aldosterone biosynthesis. Proc Fourth Int Congr Endocr, Congr Ser No 273: 761 (1972)

74. UNDERWOOD RH; WILLIAMS GH: The simultaneous measurement of aldosteroene in human peripheral plasma by displacement analysis. J Lab Clin Med 79: 848 (1972)

75. VECSEI P: Colloque internationale sur l'action extrarénale de l'aldostérone et de ses antagonistes. Nice 1971, p. 15

76. VERSANO-AHARON N; ULICK S: The effect of isotopic substitution on the binding of teststerone to its transport protein. J Clin Endocr Metab 38: 486 (1974)

77. VOGT W; POPP B; KNEDEL M: Ein modular aufgebautes Computer-programm zur Ergebniswertberechnung von Radioimmunoassay und Proteinbindungstests. Z Klin Chem Klin Biochem 11: 438 (1973)

78. WALDHÄUSL W; HADYL H; FRISCHAUF H: Determination of aldosterone by Sephadex LH-20 chromatography and radioimmunoassay. Steroids 20: 727 (1972)

79. WEST CD; NAHAJAK DK; CHAVRE VJ; NABROS CJ; TYLER FH: Simultaneous measurement of multiple plasma steroids by radioimmunoassay demonstrating episodic secretion. J Clin Endocr Metab 36: 1230 (1973)

80. YALOW RS; BERSON SA: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184: 1648 (1959)

81. YATES FE: Physiological control of adrenal cortical hormone secretion. In: The adrenal cortex, hsg. von EINSTEIN AB, Little, Brown, Boston 1967

82. YOSHIMI T; LIPSETT MB: The measurement of plasma progesterone. Steroids 11: 527 (1968)

L e b e n s l a u f

09.09.1948	geboren in Planegg bei München
1954 – 1959	Besuch der Volksschule in Gräfelfing bei München
1959	Übertritt in das Kurt-Huber-Gymnasium in Gräfelfing
1968	Reifeprüfung
1968 – 1975	Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München
19.06.1975	Staatsexamen
	Medizinalassistenzzeit am Kreiskrankenhaus Bad Aibling
13.09.1976	Approbation als Arzt
	2 Monate Assistenzarzt an der Abt. für Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Bad Aibling
	15 Monate Grundwehrdienst als Sanitätsoffizier
seit 01.01.1978	Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie in der Ausbildung zum Arzt für Anästhesiologie